

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

## IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.

PCT

世界知的所有権機関

国際事務局



特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(51) 国際特許分類6  C12N 15/00, 9/90		A1	(11) 国際公開番号  WO96/28545
			(43) 国際公開日  1996年9月19日(19.09.96)
(21) 国際出願番号 PCT/JP96/00574 (22) 国際出願日 1996年3月8日(08.03.96)		(81) 指定国 AU, NO, US, 欧州特許(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).	
(30) 優先権データ 特願平7/51234 1995年3月10日(10.03.95) JP  (71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 麒麟麦酒株式会社 (KIRIN BEER KABUSHIKI KAISHA)[JP/JP] 〒104 東京都中央区新川二丁目10番1号 Tokyo, (JP) (72) 発明者: および (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ) 梶原 将(KAJIWARA, Susumu)[JP/JP] 〒158 東京都世田谷区奥沢五丁目11番9号 Tokyo, (JP) 三沢典彦(MISAWA, Norihiko)[JP/JP] 近藤恵二(KONDO, Keiji)[JP/JP] 〒236 神奈川県横浜市金沢区福浦一丁目13番5号 麒麟麦酒株式会社 基盤技術研究所内 Kanagawa, (JP) (74) 代理人 弁理士 平木祐輔, 外(HIRAKI, Yusuke et al.) 〒105 東京都港区虎ノ門二丁目7番7号 虎ノ門中田ビル2F Tokyo, (JP)		(81) 指定国 AU, NO, US, 欧州特許(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).  添付公開書類 明細書とは別に規則13の2に基づいて提出された微生物の寄託に関する表示 国際事務局による受理の日付: 1996年3月22日(22.03.96)	

(54) Title : DNA STRAND USEFUL IN INCREASING CAROTENOID YIELD

(54) 発明の名称 カロチノイド生産量の増量に有用なDNA鎖

(57) Abstract

A DNA strand having a characteristic of increasing the yield of carotenoid and containing a base sequence which encodes a polypeptide substantially having an amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 1 or SEQ ID NO: 2; a DNA strand hybridizable with the above DNA strand; and a process for producing carotenoid which comprises introducing the above-mentioned DNA strand into a carotenoid-producing microorganism and incubating the obtained transformant in a medium to thereby increase the carotenoid content in the culture. This process makes it possible to significantly increase the yield of carotenoid in the microbial biosynthesis of the same.

(57) 要約

羊血に対する血液面積率が坪量 $150\text{ g/m}^2$ において30%以上であることを特徴とする吸血液性樹脂組成物およびこれを含有してなる吸収性物品である。本発明の吸血液性樹脂組成物は、血液に対する吸収特性に優れるので、生理用ナプキン、タンポン、医療用血液吸収性物品、創傷保護材、創傷治癒材、手術用廃液処理剤等に使用した場合極めて有用である。

情報としての用途のみ  
PCTに基づいて公開される国際出願をパンフレット第一頁にPCT加盟国を同定するために使用されるコード

AL アルバニア	DE ドイツ	LI リヒテンシュタイン	PL ポーランド
AM アルメニア	DK デンマーク	LC セントルシア	PT ボルトガル
AT オーストリア	ES エストニア	LK スリランカ	RO ルーマニア
AU オーストラリア	FI スペイン	LS リベリア	RU ロシア連邦
AZ アゼルバイジャン	FR フィンランド	LT レソト	SDE スーダン
BA ボスニア・ヘルツェゴビナ	GAB フランス	LU リトアニア	SGE スウェーデン
BB バルバドス	GAB ガボン	LV ルクセンブルグ	SGP シンガポール
BEE ベルギー	GBR イギリス	MC ラトヴィア	SI シロヴェニア
BFF ブルキナ・ファソ	GE グルジア	MD モナコ	SKN スロヴァキア
BG ブルガリア	GN ギニア	MG モルドバ共和国	SSK セネガル
BJ ベナン	GR ギリシャ	MG マダガスカル	SZD セネガル
BR ブラジル	HUE ハンガリー	MK マケドニア旧ユーゴスラ	TG チャド
BY ベラルーシ	IEL イラエル	ML ヴィア共和国	TJ トジキスタン
CA カナダ	ILS イスラエル	MN モンゴル	TM トルコメニスタン
CFG 中央アフリカ共和国	IT イタリア	MR モーリタニア	TR トリニダード・トバゴ
CGG コンゴ	JP 日本	MW マラウイ	TTA トクリーナ
CHI スイス	KE ケニア	MX メキシコ	UGA ウガンダ
CIR コート・ジボアール	KG キルギスタン	NE ニジェール	USG アメリカ合衆国
CMN カメルーン	KP 朝鮮民主主義人民共和国	NL オランダ	UZ ウズベキスタン
CNU 中国	KR 大韓民国	NO ノールウェー	VN ヴィエトナム
CUB キューバ	KZ カザフスタン	NZ ニュー・ジーランド	
CZ チェコ共和国			

## 明細書

## カロチノイド生産量の増量に有用なDNA鎖

## 技術分野

本発明は、カロチノイドの生合成において、カロチノイド含量を増量させるDNA鎖、および、このDNA鎖をカロチノイド産生微生物に導入し、発現させることにより、カロチノイド含量を増量させることを特徴とするカロチノイドの製造法に関するものである。

## 背景技術

カロチノイド (carotenoid) とは、通常、炭素鎖が40のイソプレン骨格からなる自然界に豊富に存在する天然色素の総称である。現在までに、約600種類のカロチノイドが単離、同定されている [Key to Carotenoids. Basel・Boston, Birkhauser, 1987. (Pfander, H. ed.) 参照]。カロチノイドは、ステロイドやテルペノイドと途中まで共通なイソプレノイド生合成経路によって合成される。イソプレン基本生合成経路により、ヒドロキシメチルグルタリル-CoA (HMG-CoA) は、メバロン酸を経て、C5のイソペンテニルピロリン酸 (IPP) に変換され、IPPは異性化反応によりジメチルアリルピロリン酸 (DMAPP) に変換される。さらに、DMAPPは、C5のIPPと順次、縮重合することにより、C10のゲラニルピロリン酸 (GPP) 、C15のファルネシリピロリン酸 (FPP) 、C20のゲラニルゲラニルピロリン酸 (GGPP) というふうに、炭素数を5つづつ延ばしていくのである（第1図）。

カロチノイド生合成経路は、GGPPにおいてイソプレン基本生合成経路から分岐する。すなわち、2分子のGGPPが縮合して、最初のカロチノイドである無色のフィトエン (phytoene) が合成される。フィトエンは不飽和反応によりリコ펜 (lycopene) に変換され、さらに、リコ펜は環化反応により  $\beta$ -カロチン ( $\beta$ -carotene) に変換される。そして、 $\beta$ -カロチンに水酸基やケト基などが導入され、ゼアキサンチン (zeaxanthin) やアスタキサンチン (astaxanthin) などの種々のキサントフィルが合成される。

最近、発明者らは、植物常在非光合成細菌 Erwinia uredovora のカロチノイド生合成遺伝子群を、その黄色の色調を指標に大腸菌にクローニングし、これらの遺伝子の機能を明らかにした後、これらの遺伝子のいろいろな組み合わせを導入、発現させることにより、大腸菌、酵母などの微生物に、フィトエン、リコペン、 $\beta$ -カロチン、ゼアキサンチンなどを生産させることを可能にした（第2図参照）： [Misawa, N., Nakagawa, M., Kobayashi, K., Yamano, S., Izawa, Y., Nakamura, K., Harashima K., "Elucidation of the Erwinia uredovora carotenoid biosynthetic pathway by functional analysis of gene products expressed in Escherichia coli". J. Bacteriol., 172, p. 6704-6712, 1990] 及び、 Misawa, N., Yamano, S., Ikenaga, H., "Production of  $\beta$ -carotene in Zymomonas mobilis and Agrobacterium tumefaciens by introduction of the biosynthesis genes from Erwinia uredovora". Appl. Environ. Microbiol., 57, p. 1847-1849, 1991] 及び、 Yamano, S., Ishii, T., Nakagawa, M., Ikenaga, H., Misawa, N., "Metabolic engineering for production of  $\beta$ -carotene and lycopene in Saccharomyces cerevisiae". Biosci. Biotech. Biochem., 58, p. 1112-1114, 1994] 及び、本発明者らによる特許出願特願平3-58786号公報（特願平2-53255号明細書）：「カロチノイドの合成に有用なDNA鎖」参照]。すなわち、 Er. uredovora のカロチノイド生合成遺伝子群によりFPPからカロチノイドを合成することができるが、 FPPは、カロチノイドだけでなく、ステロイドやテルペノイドの共通の基質であるので、カロチノイドを合成できない微生物でも、 FPPは有している。したがって、たとえば、 FPPから  $\beta$ -カロチンの生合成に必要な4つの crt 遺伝子、 crtE, crtB, crtI, crtY を導入すると、その導入された微生物は  $\beta$ -カロチンを産生するようになる（第2図参照）。さらに、発明者らは、同様の手法により、海洋細菌 Agrobacterium aurantiacum のカロチノイド生合成遺伝子群を大腸菌にクローニングし、これらの遺伝子と上記の Er. uredovora のカロチノイド遺伝子のいろいろな組み合わせを発現させることにより、大腸菌などの微生物に、さらに、アスタキサンチン、カンタキサンチンなどを生産させることも可能にした（第3図参照）：（三沢典彦ら、「遺伝子レベルでのアスタキサンチン生合成経路の解明」第36回天然有機化合物

物討論会講演要旨集p. 175-180, 1994)。前述したカロチノイドの中でも、特に、アスタキサンチン、ゼアキサンチン、 $\beta$ -カロチンは、赤色や黄色の天然着色料として、癌予防や免疫賦活活性やプロビタミンA活性を有する栄養価改善剤として、食用や飼料用にすでに実用化され、有望視されているものである。したがって、発明者らが取得したカロチノイド生合成遺伝子を用いることによって、これらを外来遺伝子として遺伝子工学的手法により大腸菌などの微生物を形質転換し発現させることによって、大腸菌などの微生物に、これらの有用カロチノイドの生合成能を付与することが可能となった。これまでには、有用カロチノイドの微生物生産を行うためには、そのカロチノイドを十分量合成できる微生物を探し、培養条件の検討や突然変異処理などによって、その生産量を上げることを試みることぐらいしか検討できることはなかった。発明者らの研究により、生産菌となる微生物のカロチノイド合成能の有無にかかわりなく、増殖が容易でしかも速く、たとえ食用として用いても安全性が保証されているような微生物を、カロチノイド生産のための宿主として選ぶことができるようになった。もちろん、最初から有用カロチノイドを十分量合成できるような微生物を宿主として用い、Er. uredovora やAg. aurantiacum のカロチノイド生合成遺伝子の導入により、その生産量をさらに上げたり、最終カロチノイド産物を変換したりすることも可能である。たとえば、最終産物として $\beta$ -カロチンを合成できる微生物に、Ag. aurantia cumのcrtW とcrtZ遺伝子を導入し、発現させることにより、アスタキサンチンを最終産物として生産する微生物に変換することが可能となった。

一方、アスタキサンチンや $\beta$ -カロチンは、有機合成法によっても合成される。有機合成法においては、これらのカロチノイドが飼料や食品添加剤として用いられることを考慮すると、反応時に生ずる副生成物等の面で問題が残り、また、消費者の天然物嗜好にも反している。しかしながら、価格的には、従来の発酵法によるカロチノイド生産は有機合成法に勝てないのが現状であった。すでに述べてきたように、上記のカロチノイド生合成遺伝子の利用により、発酵法によるカロチノイドの生産法を改善することが可能であり、そのことにより、価格的に有機合成法に対抗することが可能になると考えられるが、その成否は、微生物に蓄積するカロチノイドの含量をどこまで上げられるかということにかかっているの

である。それゆえ、微生物によるカロチノイドの生産において、カロチノイド含量を増量させるような技術が望まれていた。

従来、微生物によるカロチノイドの生合成において、カロチノイドの合成量を増量させるための手段としては、NTGなどの突然変異剤によるランダムミューテーションにより、カロチノイド含量が増量した変異株を選抜するという伝統的方法しかなかった。しかし、この方法は技術者の多大の時間と労力を必要とし、しかも、カロチノイドの合成量の増量に成功したとしても、理論的裏付けが無いので、その後、頻繁に起こる回帰自然突然変異によるカロチノイド含量の減少を食い止めるのにも多大の時間と労力を必要としたのである。

### 発明の開示

本発明の課題は、微生物によるカロチノイドの生合成において、その生産量を増量させることにある。

発明者らは、上記課題を解決すべく、鋭意研究を重ねた結果、たった1種類の遺伝子を含むDNA鎖をカロチノイド産生微生物に導入し、発現させることにより、その微生物のカロチノイド生産量を数倍上げることができる技術を開発した。

すなわち、本発明者らは、タンパク質のアミノ酸配列が、実質的に、IPPからDMAPPの変換を触媒する酵素であるIPPイソメラーゼをコードする遺伝子を含むDNA鎖を、Er. uredovoraなどのカロチノイド合成遺伝子を有する大腸菌などの微生物に導入すると、リコ펜、β-カロチンなどのカロチノイド含量がコントロールの1.5～4.5倍に増量することを見い出し、本発明を完成するに至った。なお、タンパク質のアミノ酸配列が、実質的に、IPPからDMAPPの変換を触媒する酵素であるIPPイソメラーゼをコードする遺伝子は、アスタキサンチン産生微生物であるPhaffia rhodozymaやHaematococcus pluvialisなどから得られた。

本発明によるDNA鎖は下記に示すものである。

(1) カロチノイドの生産量を増量させる特性を有し、アミノ酸配列が実質的に配列番号1に示した配列を有するポリペプチドをコードする塩基配列を含むDNA鎖、またはそれとハイブリダイズするDNA鎖。

(2) カロチノイドの生産量を增量させる特性を有し、アミノ酸配列が実質的に配列番号2に示した配列を有するポリペプチドをコードする塩基配列を含むDNA鎖、またはそれとハイブリダイズするDNA鎖。

本発明はまた、カロチノイドの製造法にも関する。  
すなわち、本発明によるカロチノイドの製造法は下記に示すものである。

(3) 上記(1)～(2)のいずれかに記載のDNA鎖をカロチノイド産生微生物に導入して該形質転換微生物を培地で培養し、培養物のカロチノイド含量を増量させることを特徴とする、カロチノイドの製造法。

(4) アミノ酸配列が実質的に配列番号3に示した配列を有するポリペプチドをコードする塩基配列を含むDNA鎖、またはそれとハイブリダイズするDNA鎖をカロチノイド産生微生物に導入して該形質転換微生物を培地で培養し、培養物のカロチノイド含量を増量させることを特徴とする、カロチノイドの製造法。

以下、本発明を詳細に説明する。

「従来の技術」の項で詳しく述べたように、非光合成土壌細菌Erwinia uredovoraおよび海洋細菌Agrobacterium aurantiacumなどのカロチノイド生合成遺伝子を導入することにより、大腸菌などの微生物は、アスタキサンチン、ゼアキサンチン、 $\beta$ -カロチン、リコ펜などの有用カロチノイドを生産するようになる。一方、価格的に、有機合成法に競合するためには、カロチノイドの生産量をできるだけ上げる必要がある。本発明によるIPPイソメラーゼ遺伝子（アミノ酸配列が実質的にIPPイソメラーゼであるポリペプチドをコードする遺伝子を含む）は、このカロチノイドの生産量の增量に極めて有用である。現在の進んだ遺伝子工学的手法により、外来遺伝子の発現レベルを上げることにより、その外来遺伝子がコードするタンパク質の生産量を上げることは比較的容易である。しかしながら、いくらタンパク質の生産量を上げたところで、そのタンパク質（酵素）が必要とする基質量が限られていれば、カロチノイドなどのバイオケミカルズの高生産には結びつかない。たとえば、カロチノイド合成遺伝子群の発現レベルを向上させたところで、それらの最初の基質であるFPPが細胞内に十分に無ければ、カロチノイドの高生産に結びつかない。今回、IPPイソメラーゼ遺伝子を導

入することによりカロチノイド生産量の増量に成功したのは、そのことによりFP Pまでの上流の経路（第1図参照）が太くなり、結果的にFPPの供給量が増えることにより、カロチノイドの増量に結びついたと考察することができる。しかしながら、本発明は、IPPからDMAPP、または、DMAPPからIPPへの変換を触媒する酵素であるIPPイソメラーゼ、または、IPPイソメラーゼと相同性を有するタンパク質をコードする遺伝子を、カロチノイドを生産する大腸菌などの微生物に導入し、発現させると、これらカロチノイドの生産量が増量されることを見いだしたことに端を発している。すなわち、Er. uredovoraのカロチノイド生合成群の利用により $\beta$ -カロテンを产生する大腸菌を宿主として、Phaffia rhodozyma a、Haematococcus pluvialisなどのcDNA発現ライブラリーを作製し、 $\beta$ -カロテン含量が増加することにより、黄色の色調が明るくなり橙色に近づいたコロニーが出現したので、その大腸菌が有するプラスミドを分析した結果、Saccharomyces cerevisiaeのIPPイソメラーゼと高い相同性を有する遺伝子が存在することを見いだしたのである。従来から、HMG-CoAからメバロン酸への反応を触媒するHMG-CoAレダクターゼ（第1図）がカロチノイドを含むテルペノイドの律速段階酵素かもしれないという推察は存在していたが、IPPイソメラーゼについてはそのような報告は無く、IPPイソメラーゼをコードする遺伝子を導入することにより、カロチノイドの生産量が増量されるというのは新知見であった。

すなわち、本発明は、カロチノイドの生産量を増量させる特性を有していてアミノ酸配列が実質的にIPPイソメラーゼであるポリペプチドをコードする塩基配列を含むDNA鎖、及び、このDNA鎖をカロチノイド産生微生物に導入して該形質転換微生物を培地で培養し、培養物のカロチノイド含量を増量させることを特徴とする、カロチノイドの製造法を提供するものである。

本発明によるDNA鎖は、前記(1) (2)に記載されるDNA鎖、またはそれらとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNA鎖である。

本発明によるDNA鎖がコードするポリペプチドは、アミノ酸配列が実質的に配列番号1（第4、5図ではA～B）、配列番号2（第6、7図ではC～D）に示した配列を有するものである。本発明において、これらのDNA鎖によってコードされるポリペプチド（すなわちアミノ酸配列が実質的にIPPイソメラーゼであるタン

パク質)は、前述のようなカロチノイド増量活性を有する限りアミノ酸のいくつかについて欠失、置換、付加等の変化があってもよい。このことは、「アミノ酸配列が実質的に配列番号1、配列番号2に示した配列を有する」ということと対応している。たとえば、この酵素の第1番目のアミノ酸(Met)が欠失しているものなどもこのアミノ酸配列の変化によるポリペプチドないしは酵素に包含される。なお、各ポリペプチドをコードする本発明DNA鎖は、配列番号1、2(第4.5.6.7図)に示したアミノ酸配列をコードする塩基配列をもつものの他に、縮重コドンにおいてのみ異なる同一のポリペプチドをコードする縮重異性体をも包含するものであることはいうまでもない。

#### DNA鎖の取得

上記のタンパク質のアミノ酸配列をコードする塩基配列を有するDNA鎖を取得する一つの手段は、核酸合成の方法に従って、その鎖長の少なくとも一部を化学合成することであるが、結合アミノ酸が多数であるということを考えれば、この化学合成法よりもHaematococcus pluvialisまたはPhaffia rhodozymaなどのcDNAライブラリーを大腸菌で作製し、このライブラリーから遺伝子工学の分野で慣用されている方法、たとえば適当なプローブによるハイブリダイゼーション法、により、これを取得するほうが好ましいと言える。

#### 大腸菌などの微生物の形質転換および遺伝子発現

上述のような本発明DNA鎖を、適当なカロチノイド産生細菌(たとえば、Erwinia uredovoraのカロチノイド生合成遺伝子群を含む大腸菌、Zymomonas mobilisやカロチノイド産生酵母(たとえば、Erwinia uredovoraのカロチノイド生合成遺伝子群を含むSaccharomyces cerevisiae)などの微生物に導入することにより、カロチノイド含量を増量させることができる。

以下は、好ましい微生物への外来遺伝子の導入法の概要について記載したものである。

大腸菌等の微生物への外来遺伝子の導入および発現のための手順ないし方法は、本発明において下記したところ以外のものにおいても、遺伝子工学の分野により慣用されているものを含み、その手法ないし方法(たとえば、“Vectors for cloning genes”, Methods in Enzymology, 216, p.469-631, 1992, Academic Pre

ss、および、“Other bacterial systems”, Methods in Enzymology, 204, p. 305 -636, 1991, Academic Press 参照) に準じて実施すればよい。

#### <大腸菌>

大腸菌への外来遺伝子の導入法は、ハナハンの方法、ルビジウム法などすでに確立されたいくつかの効率的方法があり、それを用いて行えばよい(たとえば、Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T., “Molecular cloning-A laboratory manual.” Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989 参照)。大腸菌での外来遺伝子の発現は常法に従って行えばよいが(たとえば、前述の “Molecular cloning -A laboratory manual.” 参照)、たとえば、pUC系やpBluescript系等のlacのプロモーター等を有する大腸菌用ベクターを用いて行うことができる。発明者等は、lacのプロモーター等を有する大腸菌用ベクター pSPORT1またはpBluescript II KSを用いて、lacのプロモーターの転写のリードスルーを受ける方向に、Haematococcus pluvialis、Phaffia rhodozyma、Saccharomyces cerevisiaeのIPPイソメラーゼ遺伝子を挿入し、これらの遺伝子を大腸菌で発現させた。

#### <酵母>

酵母Saccharomyces cerevisiaeへの外来遺伝子の導入法は、リチウム法などすでに確立された方法があり、それを用いて行えばよい(たとえば、秋山裕一監修バイオインダストリー協会編集、「酵母のニューバイオテクノロジー」医学出版センター 刊参照)。酵母での外来遺伝子の発現は、PGK や GPD 等のプロモーターおよびターミネーターを用いて、外来遺伝子をこのプロモーターとターミネーターの間に転写のリードスルーを受けるように挿入した発現カセットを構築し、この発現カセットを、S. cerevisiae のベクター、たとえば、YRp系(酵母染色体のARS配列を複製起点とする酵母用マルチコピーベクター)、YEp系(酵母の2 μm DNAの複製起点を持つ酵母用マルチコピーベクター)、YIp系(酵母の複製起点を持たない酵母染色体組込み用ベクター)等のベクターに挿入することにより行うことができる(前述の「酵母のニューバイオテクノロジー」医学出版センター刊、日本農芸化学会ABCシリーズ「物質生産のための遺伝子工学」朝倉書店刊、および、Yamano, S., Ishii, T., Nakagawa, M., Ikenaga, H., Mi

sawa, N., "Metabolic engineering for production of  $\beta$ -carotene and lycopene in Saccharomyces cerevisiae". Biosci. Biotech. Biochem., 58, P.1112-1114, 1994 参照)。

<Zymomonas mobilis>

エタノール生産細菌Zymomonas mobilisへの外来遺伝子の導入法は、グラム陰性菌に共通な接合伝達法により行うことができ、Zymomonas mobilisでの外来遺伝子の発現は、たとえばZymomonas mobilis用ベクターpZA22を用いて行うことができる(中村克己、「Zymomonas細菌の分子育種」、日本農芸化学会誌, 63, p.1016-1018, 1989、および、Misawa, N., Yamano, S., Ikenaga, H., "Production of  $\beta$ -carotene in Zymomonas mobilis and Agrobacterium tumefaciens by introduction of the biosynthesis genes from Erwinia uredovora". Appl. Environ. Microbiol., 57, p.1847-1849, 1991参照)。

微生物によるカロチノイド生産量の増量法

前述した、微生物への外来遺伝子の導入および発現のための手法ないし方法によって、カロチノイド合成遺伝子群およびIPPイソメラーゼ遺伝子を導入し、発現させることにより、多量のカロチノイドを生産できる微生物を得ることが可能となる。

ファルネシルピロリン酸(FPP)はカロチノイドだけでなく、セスキテルペン、トリテルペン、ステロール、ホパノールなどのテルペノイドと共通な基質である。一般に、微生物は、カロチノイドを合成できないものでも、テルペノイドは合成しているので、すべての微生物は、基本的に、中間代謝産物としてFPPを有しているはずである。一方、非光合成細菌Erwinia uredovoraのカロチノイド合成遺伝子群は、FPPを基質として、リコ펜、 $\beta$ -カロチン、ゼアキサンチンなどの有用カロチノイドまで合成させることができあり、海洋細菌Agrobacterium aurantiacumのカロチノイド合成遺伝子群と組み合わせることにより、カントキサンチン、アスタキサンチンなどの有用カロチノイドまで合成させることができある(第2図および第3図参照)。発明者らは、大腸菌だけでなく前記した微生物、すなわち、酵母Saccharomyces cerevisiae、エタノール生産細菌Zymomonas mobilisなどにErwinia uredovoraのcrt遺伝子群を導入し、

これらの微生物が、予想どおり、 $\beta$ -カロテンなどのカロチノイドを生産できるようになることを、すでに確認している [Yamano, S., Ishii, T., Nakagawa, M., Ikenaga, H., Misawa, N., "Metabolic engineering for production of  $\beta$ -carotene and lycopene in Saccharomyces cerevisiae". Biosci. Biotech. Biochem., 58, P.1112-1114, 1994, Misawa, N., Yamano, S., Ikenaga, H., "Production of  $\beta$ -carotene in Zymomonas mobilis and Agrobacterium tumefaciens by introduction of the biosynthesis genes from Erwinia uredovora". Appl. Environ. Microbiol., 57, p.1847-1849, 1991、および、本発明者らによる特許出願特願平3-58786号公報（特願平2-53255号明細書）：「カロチノイドの合成に有用なDNA鎖」]。

したがって、Er. uredovora 由来のカロチノイド合成遺伝子群や海洋細菌由来のカロチノイド合成遺伝子群（典型的には、Ag. aurantiacus由来のカロチノイド合成遺伝子群）を適当に組み合わせて同一の微生物に同時に導入することにより、原理的には、遺伝子導入発現系が確立しているすべての微生物に、アスタキサンチン、ゼアキサンチンなどの有用カロチノイドを生産させることが可能となるはずである。

その際に、前述した方法により、IPPイソメラーゼ遺伝子（典型的には、Haem atococcus pluvialis、Phaffia rhodozyma、または、Saccharomyces cerevisiaeなどのIPPイソメラーゼ遺伝子）を導入し、上記、カロチノイド合成遺伝子と同時に発現させることにより、有用カロチノイドの生産量を増量させることが可能となる。

#### 微生物の寄託

本発明DNA鎖である単離された遺伝子を組み込んだプラスミドを含む大腸菌JM109 株は、工業技術院生命工学工業技術研究所に下記の通りに寄託されている。括弧内はプラスミドの名称である。

(i) JM109 (pRH1)

寄託番号 : FERM BP-5032

受託年月日 : 平成7年3月6日

(ii) JM109 (pHP11)

寄託番号：FERM BP-5031

受託年月日：平成7年3月6日

(iii) JM109 (pS11)

寄託番号：FERM BP-5033

受託年月日：平成7年3月6日

#### 図面の簡単な説明

第1図は、HMG-CoAからFPPにいたるイソブレン基本生合成経路を示す。

第2図は、非光合成細菌Erwinia uredovora のカロチノイド生合成経路とカロチノイド合成遺伝子の機能を示す。

第3図は、海洋細菌Agrobacterium aurantiacum のカロチノイド生合成経路とカロチノイド合成遺伝子の機能を示す。実線は主要な生合成経路、点線はマイナーな生合成経路を表す。

第4図は、アスタキサンチン産生酵母Phaffia rhodozyma のIPPイソメラーゼ遺伝子の塩基配列とコードされるポリペプチドのアミノ酸配列を示す。図中、記号AからBは、251アミノ酸からなるポリペプチドをコードするオープン・リーディング・フレームを表す。

第5図は、第4図の配列の続き示す。

第6図は、アスタキサンチン産生緑藻Haematococcus pluvialis のIPPイソメラーゼ遺伝子の塩基配列とコードされるポリペプチドのアミノ酸配列を示す。図中、記号CからDは、259アミノ酸からなるポリペプチドをコードするオープン・リーディング・フレームを表す。

第7図は、第6図の配列の続きを示す。

第8図は、実験室酵母Saccharomyces cerevisiae のIPPイソメラーゼ遺伝子の塩基配列とコードされるポリペプチドのアミノ酸配列を示す。図中、記号EからFは、288アミノ酸からなるポリペプチドをコードするオープン・リーディング・フレームを表す。

第9図は、第8図の配列の続きを示す。

第10図は、非光合成細菌 Erwinia uredovora のカロチノイド生合成遺伝子を

含むプラスミドを示す。

第11図は、Phaffia rhodozyma、Haematococcus pluvialis、Saccharomyces cerevisiae のIPPイソメラーゼ遺伝子を含むプラスミドを示す。

第12図は、リコ펜産生各種大腸菌 (L:) の生育曲線を示す。controlは、IPPイソメラーゼ遺伝子を含まないコントロールを示す。

第13図は、リコペン産生各種大腸菌 (L:) のリコペン生産曲線を示す。controlは、IPPイソメラーゼ遺伝子を含まないコントロールを示す。

第14図は、各種大腸菌におけるリコペン (L:)、 $\beta$ -カロチン ( $\beta$ :)、フィトエン (P:) の生産量を示す。controlは、IPPイソメラーゼ遺伝子を含まないコントロールを示す。

#### 発明を実施するための最良の方法

以下の実施例は、本発明をさらに具体的に説明するためのものであり、本発明を限定するものではない。なお、ここで用いられた通常の遺伝子組換え実験は、特に言及されていない場合は、標準的な方法 (Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T., "Molecular cloning -A laboratory manual." Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) に基づいている。

#### [実施例 1] 生物材料と培養条件

アスタキサンチン産生酵母Phaffia rhodozymaは、American Type Culture Collection : ATCCに登録されているATCC 24230株を用いた。Ph. rhodozymaを培養する培地として、YM培地 (酵母エキス 0.3%、麦芽エキス 0.3%、バクトペプトン 0.5%、グルコース 1%) を用いた。アスタキサンチン産生緑藻Haematococcus pluvialisは、財団法人 地球・人間環境フォーラム (Global Environmental Forum)に登録されている NIES-144 株を用いた。Ha. pluvialisを培養する培地として、基本培地 (酵母エキス 0.2%、酢酸ナトリウム 0.12%、L-アスパラギン 0.04%、塩化マグネシウム・六水和物 0.02%、硫酸第一鉄・七水和物 0.001%、塩化カルシウム・二水和物 0.002%) を用い、20°C、12時間明 (20  $\mu$ E/m<sup>2</sup> · s) / 12時間暗条件下で約4日間培養した。また、Ha. pluvialisのアスタキサンチン合成を誘導するために、シスト化という、いわゆ

る分化を誘導しなければならない。シスト化の誘導条件としては、酢酸を最終濃度45 mM、硫酸第一鉄・七水和物を最終濃度450 μMになるように加え、20°C、光強度125 μE/m<sup>2</sup>·sで約12時間培養した。実験室酵母Saccharomyces cerevisiaeは、Yeast Genetic Stock Centerに登録されているS288C株を用いた。S. cerevisiaeを培養する培地として、YPD培地（酵母エキス 1%、バクトペプトン 2%、グルコース 2%）を用いた。

#### [実施例2] Phaffia rhodozymaの全RNAの調製

Phaffia rhodozyma ATCC 24230株を400 mlのYM培地に植菌して20°C、約24時間振盪培養した。培養液の濁度がOD600=0.4になったところで菌体を集菌し、液化窒素で凍結したものを-80°Cの冷凍庫に保存して、これを全RNAの調製の材料とした。凍結した菌体を氷上で融解した後、6 mlのANEバッファー（10 mM 酢酸ナトリウム、100 mM 塩化ナトリウム、1 mM EDTA : pH 6.0）を加え懸濁し、続いて界面上までガラスピーブルを加えた。更に600 μlの10% SDSと6 mlの65°Cに温めたフェノールを加え、65°Cで5分間保温した。この際30秒毎にボルテックスを行い、菌体を破碎した。保温後、室温まで素早く冷却して1500×g、10分間、室温で遠心分離した。上層を抽出して等量のフェノールを加え、2分間ボルテックスを行い、1500×g、10分間、室温で遠心分離した。続いて等量のフェノール：クロロホルム（1:1）、クロロホルムを用いて同上の操作を行った後、抽出した上層に10分の1量の3 M 酢酸ナトリウムと3倍量のエタノールを加え、-20°Cの冷凍庫で30分間冷却した。15000 × g、15分間、4°Cで遠心し、70%エタノールでリーンスし、乾燥した後、200 μlの滅菌水に溶解したものをPh. rhodozymaの全RNA溶液とした。この調製法で1.6 mgの全RNAが得られた。

#### [実施例3] Haematococcus pluvialisの全RNAの調製

Haematococcus pluvialis NIES-144 株を800 mlの基本培地に植菌して20°C、光強度20 μE/m<sup>2</sup>·s、明暗サイクル12時間明／12時間暗条件下で約4日間培養し、続いて酢酸を最終濃度45 mM、硫酸第一鉄・七水和物を最終濃度450 μMになるように加え、20°C、光強度125 μE/m<sup>2</sup>·sで約12時間培養した。培養液

から菌体を集菌し、液化窒素で凍結して、乳鉢で菌体が粉末状になるまで破碎した。粉末状の破碎菌体に3 mlのISOGEN-LS [(株)ニッポンジーン]を加え、室温で5分間放置し、さらに0.8 mlのクロロホルムを加えた後、15秒間激しく攪拌して3分間、室温で放置した。12000×g、15分間、4°Cで遠心分離して上層を抽出し、2 mlのイソプロパノールを加えて10分間、室温で放置後、12000×g、10分間、4°Cで遠心分離した。続いて70%エタノールで沈殿物をリノスし、乾燥した後、1 mlのTE緩衝液 (10 mMトリス-HCl pH8.0, 1 mM EDTA)に溶解したものを Ha. pluvialisの全RNA溶液とした。この調製法で4.1 mgの全RNAが得られた。

[実施例4] Phaffia rhodozyma及びHaematococcus pluvialisのcDNA発現ライブラーの作製

オリゴテックスードT30スーパー [宝酒造(株)]を用いてPhaffia rhodozyma及びHaematococcus pluvialisの各全RNA約1 mgからポリA+RNAをそれぞれ精製した。精製方法は、添付の製品説明書の使用方法に従った。この方法でPh. rhodozymaでは、約 26 μg、Ha. pluvialisでは約 14 μgのポリA+mRNAを精製した。

cDNAの作製は、スーパースクリプトTMプラスミドシステム (GIBCO BRL社) を用い、添付の説明書の使用方法を一部改変して以下の通りに行った。約 5 μgのポリA+mRNAを用い、制限酵素NotIの認識配列と15mersのオリゴdTからなる合成DNAをプライマーとして逆転写酵素SUPERSCRIPT RTで相補鎖DNAを合成し、続いてEscherichia. coli DNA リガーゼ、E. coli DNA ポリメラーゼ、E. coli DNA RNase Hを用いて2本鎖cDNAを合成した後、制限酵素SalIのリンカーをT4 DNA リガーゼで結合させ、最終的にcDNAの上流末端がSalI部位、ポリAの下流がNotI部位になるように作製した。電気泳動法を用いて、これらcDNAのサイズ分画を行い、0.7 kb~3.5 kbの範囲の分画を集めた。この分画のcDNAとcDNA発現ベクターpSPORT I NotI-SalI-Cutとを上キットに含まれているライゲーションバッファー(50 mM トリス-HCl pH 7.6, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM ATP, 1 mM DTT, 5% PEG 8000)及びT4 DNA リガーゼを用いてライゲーションした。このcDNA発現ベクターpSPORT Iは、SalI部位の上流にlacプロモーターをもち、大腸菌内でcD

NAを発現させることができるベクターである。次にライゲーションしたDNA溶液を全て使って、Molecular Cloning 2nd edition : Cold Spring Harbor Laboratory , 1.21-1.41 (1989) の方法に従って調製した大腸菌 (E. coli) DH5 $\alpha$ のコンピテントセルの形質転換を行った。Ph. rhodozymaで約20万個、Ha. pluvialisで約4万個の形質転換株が得られ、これらを全て集めた後、Molecular Cloning 2nd edition : Cold Spring Harbor Laboratory , 1.21-1.41 (1989) の方法に従い、プラスミドDNAを調製した。その結果、各々0.9 mg、0.6 mgのプラスミドDNAが得られ、これをそれぞれPh. rhodozyma及びHa. pluvialisのcDNA発現ライブラーとした。

[実施例 5] カロチノイドを産生する大腸菌の作製

Erwinia uredovoraのcrtZ以外のカロチノイド合成遺伝子群を有するプラスミドpCAR16 [Misawa, N., Nakagawa, M., Kobayashi, K., Yamano, S., Izawa, Y., Nakamura, K., Harashima, K., "Elucidation of the Erwinia uredovora carotenoid biosynthetic pathway by functional analysis of gene products expressed in Escherichia coli." Journal of Bacteriology, 172, p. 670 4-6712, 1990、及び本発明者らによる特許出願特開平3-58786号公報（特願平2-53255号明細書）：「カロチノイドの合成に有用なDNA鎖」] のBstEI 消化、Klenow酵素処理、リガーゼ反応を行うことにより、crtX遺伝子をフレームシフトにより失活させた後、 $\beta$ -カロチン産生に必要なcrtE, crtB, crtl, crtY遺伝子（第2図）を含む6.0 kb Asp718(KpnI)-EcoRI断片を取り出した。この断片を大腸菌ベクターpACYC184のEcoRV部位に挿入し、目的とするプラスミド（pACCAR16 $\Delta$ crtXと命名、第10図）を得た。このpACCAR16 $\Delta$ crtXを有する大腸菌は、クロラムフェニコール耐性を示し、かつ $\beta$ -カロチンを生産して黄色の色調を示す。次に、プラスミドpCAR16のBstEI/SnaBI消化、Klenow酵素処理、リガーゼ反応を行うことにより、crtXとcrtY遺伝子を含む2.26 kb BstEI-SnaBI断片を取り除いた後、リコペン産生に必要なcrtE, crtB, crtl遺伝子（第2図）を含む3.75 kb Asp718 (KpnI)-EcoRI断片を取り出した。この断片を大腸菌ベクターpACYC184のEcoRV 部位に挿入し、目的とするプラスミド（pACCR-T-EIB

と命名、第10図)を得た。このpACCRT-EIBを有する大腸菌は、クロラムフェニコール耐性を示し、かつリコ펜を生産して赤色の色調を示す (Cunningham Jr. F. X., Chamovitz, D., Misawa, N., Gatt, E., Hirschberg, J., "Cloning and functional expression in *Escherichia coli* of a cyanobacterial gene for lycopene cyclase, the enzyme that catalyzes the biosynthesis of  $\beta$ -carotene". FEBS Lett., 328, 130-138, 1993)。

次に、プラスミドpCAR16のBstEll/Eco52I消化、Klenow酵素処理、リガーゼ反応を行うことにより、crtX, crtY, crtl遺伝子を含む3.7 kb BstEll-Eco52I断片を取り除いた後、フィトエン産生に必要なcrtE, crtB遺伝子(第2図)を含む2.3 kb Asp718 (KpnI)-EcoRI断片を切り出した。この断片を大腸菌ベクターpACYC184のEcoRV部位に挿入し、目的とするプラスミド(pACCRT-EBと命名、第10図)を得た。このpACCRT-EBを有する大腸菌は、クロラムフェニコール耐性を示すが、フィトエンは無色のため、色調には変化はない (Linden, H., Misawa, N., Chamovitz, D., Pecker, I., Hirschberg, J., Sandmann, G., "Functional complementation in *Escherichia coli* of different phytoene desaturase genes and analysis of accumulated carotenes". Z. Naturforsch., 46c, 1045-1051, 1991)。

#### [実施例6] $\beta$ -カロチン産生量を増加させる遺伝子のスクリーニング

上記プラスミドpACCAR16ΔcrtXを保持する大腸菌JM101が $\beta$ -カロチンを産生して黄色くなることを利用して、この大腸菌にPhaffia rhodozymaまたはHaematoxococcus pluvialisのcDNA発現ライブラリーを導入することで、より黄色の色調が濃くなった形質転換体が現われるかどうかの検討を行った。まず、Molecular Cloning 2nd edition : Cold Spring Harbor Laboratory, 1.21-1.41 (1989) の方法を用い、pACCAR16ΔcrtXを保持する大腸菌JM101のコンピテントセルを作製した。次に、このコンピテントセル 1 mlに対してPh. rhodozymaおよびHa. pluvialisのcDNA発現ライブラリーを各100ngずつを導入し、それぞれ約20万個および約4万個の形質転換体を、150  $\mu$ g/mlのアンピシリン、30  $\mu$ g/mlのクロラムフェニコール、1 mMのIPTGを含むLBプレート(1%バクトリプトン、0.5

%酵母エキス、1% NaCl、1.5%寒天) 上に蒔くことによるスクリーニングを行い、他の株より黄色の色調が濃い株をPh. rhodozymaで5株、Ha. pluvialisで10株、単離することができた。これらの株からプラスミドDNAを抽出して制限酵素分析を行った結果、各々の5株、10株は、それぞれ共通のDNA断片を含んでいることがわかった。なお、これらのcDNA発現ライブラリーに由来するプラスミドのうち、Ph. rhodozyma由来のプラスミドの1つをpRH1(第11図)、Ha. pluvialis由来のプラスミドの1つをpHP1と命名し、さらにpHP1をSallとNotIで消化してcDNA断片部分を取り出し、pBluescriptII KS+に挿入したものをpHP1(第11図)と命名し、これらのプラスミドを以後の実験に用いた。

**[実施例7]  $\beta$ -カロチン産生量を増加させる遺伝子の塩基配列決定**

プラスミドpRH1、pHP1について以下の手順で種々の長さの欠失を有するデレーションプラスミドの作製を行い、それらに用いて塩基配列の決定を行った。pRH1はEcoRIとPstIまたはNotIとSphIで分解し、pHP1はAatIIとBamHIまたはKpnIとEcoRIで分解した後、フェノール／クロロホルム抽出を行い、エタノール沈殿によりDNAを回収した。それぞれのDNAを100  $\mu$ lのExoIIIバッファー(50 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM 2-メルカプトエタノール、pH 8.0)に溶解し、180ユニットのExoIIIヌクレアーゼを加えて37°Cで保温した。30秒ごとに10  $\mu$ lをサンプリングして、10  $\mu$ lのMBバッファー(40 mM NaCl, 2 mM ZnCl<sub>2</sub>, 10%グリセロール、pH 4.5)の入った氷上のチューブに移した。サンプリング終了後、得られた10本のチューブを65°C、10分間保温して酵素を失活させた後、5ユニットのマンギビーンヌクレアーゼを加えて37°Cで30分保温した。さらに、アガロースゲル電気泳動により、1つのプラスミド由来のものについて10種のそれぞれ欠失の程度が異なるDNA断片を回収した。回収したDNAはKlenow酵素により末端を平滑化し、16°C、一晩ライゲーション反応した後、大腸菌DH5 $\alpha$ を形質転換した。得られた種々のクローンについてプラスミドを調製し、アプライドバイオシステム(株)の蛍光プライマーサイクルシークエンスキットを用いてシークエンシング反応を行い、自動シークエンサーを用いて塩基配列を決定した。

その結果、pRH1のPhaffia rhodozyma由来cDNAは1099塩基対 (bp) の塩基配列からなり（配列番号4）、251アミノ酸からなるポリペプチドをコードするオープン・リーディング・フレームが存在することがわかった（第4～5図におけるAからBに対応）。pHP1のHaematococcus pluvialis由来cDNAは1074 bpの塩基配列からなり（配列番号5）、259アミノ酸からなるポリペプチドをコードするオープン・リーディング・フレームが存在することがわかった（第6～7図におけるCからDに対応）。このオープン・リーディング・フレームから予想されたアミノ酸配列をGene Bankにて相同性を検索した結果、Ph. rhodozymaおよびHa. pluvialisのアミノ酸配列は、両方とも、それぞれ、そのアミノ酸配列がすでに報告されているSaccharomyces cerevisiaeのIPPイソメラーゼ遺伝子（Anderson, M. S., Muehlbacher, M., Street, I. P., Profitt, J., Poulter, C. D., "Isopentenyl diphosphate: dimethylallyl diphosphate isomerase -an improved purification of the enzyme and isolation of the gene from Saccharomyces cerevisiae". J. Biol. Chem., 264, P. 19169-19175, 1989 参照）と27.0%およびび20.3%のアイデンティティーという高い相同性を有していることがわかったので、IPPイソメラーゼ遺伝子であると同定された。

#### [実施例8] Saccharomyces cerevisiaeの全DNAの調製

Saccharomyces cerevisiaeの全DNAの調製は、Methods in Yeast Genetics: a laboratory course manual : Cold Spring Harbor Laboratory, p131-132 (1990) に示された方法で以下の様に行った。Sa. cerevisiae S288Cを10 mlのYPD培地に植菌し、一晩、30℃で培養した。培養した菌体を集菌し、0.5 mlの滅菌水で懸濁して洗浄した。再度、菌体を集菌して上清を取り除き、0.2 mlの2% Triton X-100, 1% SDS, 100 mM NaCl, 10 mM Tris-Cl (pH 8), 1 mM EDTAと0.2 mlのフェノール：クロロホルム：イソアミルアルコール(25:24:1)と0.3gのガラスビーズを加え、3～4分間ボルテックスにかけた後、0.2 mlのTE buffer (10mM Tris-Cl(pH 8), 1 mM EDTA)を加えた。5分間遠心分離した後、上層を移して1 mlのエタノールを加え、再度、2分間の遠心分離を行った。得られた沈殿物を0.4 mlのTE bufferに溶解し、2μlの10mg/mlのRNase Aを加えてから、5分間37℃

に放置した。次に10μlの4 M 酢酸アンモニウムと1 mlのエタノールを加え、よく混合した後、2分間遠心して沈殿物を回収した。沈殿物を乾燥した後、50 μlのTE bufferに溶解してSa. cerevisiae S288Cの全DNAとした。この操作で、3.4 μgの全DNAが得られた。

[実施例9] PCR法によるSaccharomyces cerevisiaeのIPPイソメラーゼ遺伝子の単離

前述の文献 (Anderson, M. S., Muehlbacher, M., Street, I. P., Profitt, J., Poulter, C. D., "Isopentenyl diphosphate: dimethylallyl diphosphate isomerase -an improved purification of the enzyme and isolation of the gene from *Saccharomyces cerevisiae*". J. Biol. Chem., 264, P.19169-19175, 1989) に報告されているSa. cerevisiaeのIPPイソメラーゼ遺伝子の塩基配列をもとに、以下のプライマーを合成した。

プライマーNo.1 5' -TCGATGGGGTTGCCCTTCTTTCCG-3'

プライマーNo.2 5' -CGCGTTGTTATAGCATTCTATGAATTGCC-3'

PCRで増幅するIPPイソメラーゼ遺伝子の上流側末端がTaqI 部位、下流側末端がAccI部位になるようにデザインした。PCRは、200ngのSa. cerevisiae全DNAとPfuDNAポリメラーゼ (STRATAGENE)を使って30サイクルで行った。PCRで得られたIPPイソメラーゼ遺伝子を大腸菌内で発現させるために、TaqI とAccIで消化し、ベクターpBluescriptII KS+ のClal 部位とSmaI 部位に挿入した。このプラスミドをpS11と命名した(第11)。このSa. cerevisiae由来DNAは1058bpの塩基配列からなり(配列番号6)、288アミノ酸からなるIPPイソメラーゼをコードする遺伝子が存在していた(第8~9図におけるEからFに対応)。

。

[実施例10] IPPイソメラーゼ遺伝子導入によるリコペン生産量の増量

ベクターpSPORT1、Phaffia rhodozymaのIPPイソメラーゼ遺伝子を含むプラスミドpRH1、Haematococcus pluvialisのIPPイソメラーゼ遺伝子を含むプラスミドpHP11、および、Saccharomyces cerevisiaeのIPPイソメラーゼ遺伝子を含

むプラスミドpSII (第11図) を、それぞれ、pACCRT-BIB (第10図) を含むリコペン生産大腸菌JM101 (以後、L:と簡略化して表す) に導入し、150  $\mu\text{g}/\text{ml}$ のアンビシリン (Ap) 、30  $\mu\text{g}/\text{ml}$ のクロラムフェニコール (Cm) 、1 mMのIPTGを含むLBプレート上にプレーティングし、28°Cで一晩培養を行った。その結果、3種類のIPPイソメラーゼ遺伝子を含むものは、いずれも、ベクターのみが入ったコントロールと比べて、リコペン産生による赤色がかなり濃くなることがわかった。さらに、これらの大腸菌の生育速度は、コントロールよりも早く、培養中、常にコントロールより大きなコロニーを形成していた。これは、IPPイソメラーゼ遺伝子の導入、発現により、FPPまでの上流の経路 (第1図参照) が太くなり、結果的にFPPの供給量が増えることにより、リコペンの增量に結びついたと考察することができ、さらに、IPPイソメラーゼ遺伝子を含まないコントロールより増殖速度が早くなかったのは、FPPの增量により、リコペン增量だけでなく、大腸菌の生育に必要なFPP由来の膜成分 (たとえば、FPPやGGPP結合タンパク質) にも十分量、基質を供給できるようになったためではないかと考えることができる。

IPPイソメラーゼ遺伝子の導入によるリコペン生産量の增量はさらに液体培養によっても確かめられた。5 mlのAp, Cmを含むLB培地で、28°C、一晩振盪培養したものから、その2 mlを200 mlのAp, Cm, 0.1 mMのIPTGを含む2YT培地 (1.6% バクトトリプトン、1% 酵母エキス、0.5% NaCl) で28°C、230 rpmで振盪培養を行った。数時間ごとに5 mlづつサンプリングを行い、生育速度とリコペン含量の測定を行った。生育速度は、650 nmの吸光度を測定することにより求めた。リコペン含量は以下のようにして求めた。すなわち、遠心分離により細胞を集め、2.5 mlのアセトンを加え、30分間放置した。この間、時折、ボルテックスにかけた。濾過を行った後、474 nmの吸光度を測定し、リコペン1 mM、1 cmセルあたりの吸光度が185.0としてリコペン含量の定量を行った。分光光度計は、JASCO UV IDEC-220Bを用いた。なお、これらの株が本当にリコペンを生産しており、474 nmの吸光度はリコペンに起因していることを、HPLCにより確認した。この条件は、実施例11に示されている。結果を、第12図 (生育曲線) 、第13図 (リコペン生産曲線) に示した。生育速度 (第12図) においては、IPPイソメラーゼ遺伝子を

含まないコントロールも含めて、いずれの株も、差は認められなかった。この結果は、前述のプレート上での結果と異なっている。おそらく、液体培養の場合は、寒天培養と違って、IPPイソメラーゼ遺伝子を含まないコントロールにおいても、大腸菌の生育に必要なFPP由来の膜成分（たとえば、FPPやGGPP結合タンパク質）への基質の供給に余裕があるためであると考えることができる。一方、リコペンの生産においては、IPPイソメラーゼ遺伝子を含まないコントロールと、他のIPPイソメラーゼ遺伝子を含む3株とは、大きな差が見られた。IPPイソメラーゼ遺伝子を含む3株は、培養中、常に、コントロールより、数倍高いリコペンの生産量を示した。培養28時間後のリコペン生産量を大腸菌菌体あたりの重さ（乾重量）で示したのが、第14図である。IPPイソメラーゼ遺伝子を含む3株は、IPPイソメラーゼ遺伝子を含まないコントロールの3.6~4.5倍の生産量を示した。なお、pHP11を含むリコペン産生大腸菌では、乾重量1 gあたり1.03 mgのリコペンを生産することができた。

[実施例11] IPPイソメラーゼ遺伝子導入による $\beta$ -カロチン生産量の増量

ベクターpSPORT1およびPhaffia rhodozymaのIPPイソメラーゼ遺伝子を含むプラスミドpRH1を、それぞれ、pACCAR16 $\Delta$ crtX（第10図）を含む $\beta$ -カロチン産生大腸菌JM101（以後、 $\beta$ :と簡略化して表す）に導入したものを5 mlのAp, Cmを含むLB培地で、28°C、一晩振盪培養したものから、その1 mlを100 mlのAp, Cm, 0.1 mMのIPTGを含む2YT培地で28°C、230 rpmで、28時間、振盪培養を行った。遠心分離により、これらから菌体を集め、0.85% NaClで洗った後、40 mlのアセトンに懸濁し、30分間放置した。この間、時折、ボルテックスにかけた。濾過した後、454 nmの吸光度を測定し、 $\beta$ -カロチン 1 mM, 1 cmセルあたりの吸光度が134.4として $\beta$ -カロチン含量の定量を行った。その結果を第14図に示した。pRH1を含む $\beta$ -カロチン産生大腸菌は、乾重量1 gあたり709  $\mu$ gの $\beta$ -カロチンを生産し、これは、IPPイソメラーゼ遺伝子を含まないコントロールの1.5倍の値を示した。

さらに、上記のアセトン抽出液を用いて、これらの株が本当に $\beta$ -カロチンを生産しており、454 nmの吸光度は $\beta$ -カロチンに起因していることを、HPLCによ

り確認した。すなわち、カラムとして、ノバパックHR  $6\mu$  C18 (3.9×300 mm) (ウォーターズ社製) を用いて、アセトニトリル/メタノール/2-プロパノール (90/6/4) で展開を行い、フォトダイオードアレイ検出器996 (ウォーターズ社製) によりモニターを行った。その結果、可視部のピークのほぼ100%が $\beta$ -カロチンであった。なお、 $\beta$ -カロチンの標品として、シグマ製の $\beta$ -カロチン有機合成品を用いた。

[実施例12] IPPイソメラーゼ遺伝子導入によるフィトエン生産量の増量

ベクターpSPORT1、Phaffia rhodozymaのIPPイソメラーゼ遺伝子を含むプラスミドpRH1、及び、Haematococcus pluvialisのIPPイソメラーゼ遺伝子を含むプラスミドpHP11を、それぞれ、pACCRT-EB (第10図) を含むフィトエン産生大腸菌JM101 (以後、P:と簡略化して表す) に導入したものを5 mlのAp, Cmを含むLB培地で、28°C、一晩振盪培養したものから、その1 mlを100 mlのAp, Cm, 0.1 mMのIPTGを含む2YT培地で28°C、230 rpmで、28時間、振盪培養を行った。遠心分離により、これらから菌体を集め、0.85% NaClで洗った後、40 mlのアセトンに懸濁し、30分間放置した。この間、時折、ボルテックスにかけた。濾過した後、ロータリーエバボレーターによる乾燥後、40 mlの石油エーテルと水で分配を行い、エーテル層の286nmの吸光度を測定し、フィトエン 1 mM, 1 cmセルあたりの吸光度が41.2としてフィトエン含量の定量を行った。また、実施例11に示したHPLCを行った結果、286nmの吸光度の70%がフィトエンに起因することがわかったので、上記の定量値の70%をフィトエン含量とした。結果を第14図に示した。IPPイソメラーゼ遺伝子を含むフィトエン産生大腸菌は、IPPイソメラーゼ遺伝子を含まないコントロールの1.7~2.1倍の生産量を示した。

以上の実施例により、IPPイソメラーゼ遺伝子の導入により、 $\beta$ -カロチン、リコ펜、及び、フィトエン産生大腸菌における、これらのカロチノイドの生産量が、実際に、数倍增量することを示した。これは、IPPイソメラーゼ遺伝子の導入、発現により、FPPまでの上流の経路 (第1図参照) が太くなり、結果的にFPPの供給量が増えることにより、これらのカロチノイドの增量に結びついたと考えられるので、ここで示した $\beta$ -カロチン、リコペン、フィトエンだけでなく、

他にも、アスタキサンチン、ゼアキサンチンなど、すべてのカロチノイドに当てはまる考えることができる。

### 産業上の利用可能性

本発明によれば、微生物によるカロチノイドの生合成において、その生産量を有意に増量させることのできるDNA鎖、ならびに該DNA鎖をカロチノイド産生微生物に導入し、発現させることにより、その微生物のカロチノイド生産量を数倍上げることができる方法が提供される。該DNA鎖は、カロチノイドだけでなく、カロチノイドと共通の基質(FPP)を有するテルペノイド等の微生物による生産に応用して同様な生産量の増量が期待される。

## 配列表

配列番号：1

配列の長さ：251

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

## 配列

Met Ser Met Pro Asn Ile Val Pro Pro Ala Glu Val Arg Thr Glu Gly

5

10

15

Leu Ser Leu Glu Glu Tyr Asp Glu Glu Gln Val Arg Leu Met Glu Glu

20

25

30

Arg Cys Ile Leu Val Asn Pro Asp Asp Val Ala Tyr Gly Glu Ala Ser

35

40

45

Lys Lys Thr Cys His Leu Met Ser Asn Ile Asn Ala Pro Lys Asp Leu

50

55

60

Leu His Arg Ala Phe Ser Val Phe Leu Phe Arg Pro Ser Asp Gly Ala

65

70

75

80

Leu Leu Leu Gln Arg Arg Ala Asp Glu Lys Ile Thr Phe Pro Gly Met

85

90

95

Trp Thr Asn Thr Cys Cys Ser His Pro Leu Ser Ile Lys Gly Glu Val

100

105

110

Glu Glu Glu Asn Gln Ile Gly Val Arg Arg Ala Ala Ser Arg Lys Leu

115

120

125

Glu His Glu Leu Gly Val Pro Thr Ser Ser Thr Pro Pro Asp Ser Phe

130

135

140

Thr Tyr Leu Thr Arg Ile His Tyr Leu Ala Pro Ser Asp Gly Leu Trp

145

150

155

160

Gly Glu His Glu Ile Asp Tyr Ile Leu Phe Ser Thr Thr Pro Thr Glu

165	170	175
His Thr Gly Asn Pro Asn Glu Val Ser Asp Thr Arg Tyr Val Thr Lys		
180	185	190
Pro Glu Leu Gln Ala Met Phe Glu Asp Glu Ser Asn Ser Phe Thr Pro		
195	200	205
Trp Phe Lys Leu Ile Ala Arg Asp Phe Leu Phe Gly Trp Trp Asp Gln		
210	215	220
Leu Leu Ala Arg Arg Asn Glu Lys Gly Glu Val Asp Ala Lys Ser Leu		
225	230	235
Glu Asp Leu Ser Asp Asn Lys Val Trp Lys Met ***		
245	250	

配列番号：2

配列の長さ : 259

## 配列の型：アミノ酸

### トポロジー：直鎖状

## 配列の種類：ペプチド

配列

Gln Gln Arg Ala Arg Ser Lys Ile Thr Phe Pro Ser Val Trp Thr Asn  
 85 90 95  
 Thr Cys Cys Ser His Pro Leu His Gly Gln Thr Pro Asp Glu Val Asp  
 100 105 110  
 Gln Leu Ser Gln Val Ala Asp Gly Thr Val Pro Gly Ala Lys Ala Ala  
 115 120 125  
 Ala Ile Arg Lys Leu Glu His Glu Leu Gly Ile Pro Ala His Gln Leu  
 130 135 140  
 Pro Ala Ser Ala Phe Arg Phe Leu Thr Arg Leu His Tyr Cys Ala Ala  
 145 150 155 160  
 Asp Val Gln Pro Ala Ala Thr Gln Ser Ala Leu Trp Gly Glu His Glu  
 165 170 175  
 Met Asp Tyr Ile Leu Phe Ile Arg Ala Asn Val Thr Leu Ala Pro Asn  
 180 185 190  
 Pro Asp Glu Val Asp Glu Val Arg Tyr Val Thr Gln Glu Glu Leu Arg  
 195 200 205  
 Gln Met Met Gln Pro Asp Asn Gly Leu Gln Trp Ser Pro Trp Phe Arg  
 210 215 220  
 Ile Ile Ala Ala Arg Phe Leu Glu Arg Trp Trp Ala Asp Leu Asp Ala  
 225 230 235 240  
 Ala Leu Asn Thr Asp Lys His Glu Asp Trp Gly Thr Val His His Ile  
 245 250 255  
 Asn Glu Ala \*\*\*

配列番号 : 3

配列の長さ : 288

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ペプチド

## 配列

Met Thr Ala Asp Asn Asn Ser Met Pro His Gly Ala Val Ser Ser Tyr  
                       5                     10                     15  
 Ala Lys Leu Val Gln Asn Gln Thr Pro Glu Asp Ile Leu Glu Glu Phe  
                      20                     25                     30  
 Pro Glu Ile Ile Pro Leu Gln Gln Arg Pro Asn Thr Arg Ser Ser Glu  
                      35                     40                     45  
 Thr Ser Asn Asp Glu Ser Gly Glu Thr Cys Phe Ser Gly His Asp Glu  
                      50                     55                     60  
 Glu Gln Ile Lys Leu Met Asn Glu Asn Cys Ile Val Leu Asp Trp Asp  
                      65                     70                     75                     80  
 Asp Asn Ala Ile Gly Ala Gly Thr Lys Lys Val Cys His Leu Met Glu  
                      85                     90                     95  
 Asn Ile Glu Lys Gly Leu Leu His Arg Ala Phe Ser Val Phe Ile Phe  
                      100                    105                    110  
 Asn Glu Gln Gly Glu Leu Leu Leu Gln Gln Arg Ala Thr Glu Lys Ile  
                      115                    120                    125  
 Thr Phe Pro Asp Leu Trp Thr Asn Thr Cys Cys Ser His Pro Leu Cys  
                      130                    135                    140  
 Ile Asp Asp Glu Leu Gly Leu Lys Gly Lys Leu Asp Asp Lys Ile Lys  
                      145                    150                    155                    160  
 Gly Ala Ile Thr Ala Ala Val Arg Lys Leu Asp His Glu Leu Gly Ile  
                      165                    170                    175  
 Pro Glu Asp Glu Thr Lys Thr Arg Gly Lys Phe His Phe Leu Asn Arg  
                      180                    185                    190  
 Ile His Tyr Met Ala Pro Ser Asn Glu Pro Trp Gly Glu His Glu Ile  
                      195                    200                    205  
 Asp Tyr Ile Leu Phe Tyr Lys Ile Asn Ala Lys Glu Asn Leu Thr Val

210	215	220
Asn Pro Asn Val Asn Glu Val Arg Asp Phe Lys Trp Val Ser Pro Asn		
225	230	235
Asp Leu Lys Thr Met Phe Ala Asp Pro Ser Tyr Lys Phe Thr Pro Trp		
245	250	255
Phe Lys Ile Ile Cys Glu Asn Tyr Leu Phe Asn Trp Trp Glu Gln Leu		
260	265	270
Asp Asp Leu Ser Glu Val Glu Asn Asp Arg Gln Ile His Arg Met Leu		
275	280	285

\*\*\*

配列番号：4

配列の長さ：1099

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

起源

生物名：Phaffia rhodozyma

株名：ATCC 24230

配列の特徴

特徴を表す記号：CDS

存在位置：99. . 851

特徴を決定した方法：E

配列

CCCACGGCTC CGCACATCTC GCATATATCA CTTTCCTCCT TCCAGAACAA GTTCTGAGTC 60

AACCGAAAAG AAAGAAGGCA GAGGAAAATA TATTCTAG ATG TCC ATG CCC AAC ATT 116

Met Ser Met Pro Asn Ile

5

GTT CCC CCC GCC GAG GTC CGA ACC GAA GGA CTC AGT TTA GAA GAG TAC	164		
Val Pro Pro Ala Glu Val Arg Thr Glu Gly Leu Ser Leu Glu Glu Tyr			
10	15	20	
GAT GAG CAG CAG GTC AGG CTG ATG GAG GAG CGA TGT ATT CTT GTT AAC	212		
Asp Glu Glu Gln Val Arg Leu Met Glu Glu Arg Cys Ile Leu Val Asn			
25	30	35	
CCG GAC GAT GTG GCC TAT GGA GAG GCT TCG AAA AAG ACC TGC CAC TTG	260		
Pro Asp Asp Val Ala Tyr Gly Glu Ala Ser Lys Lys Thr Cys His Leu			
40	45	50	
ATG TCC AAC ATC AAC GCG CCC AAG GAC CTC CTC CAC CGA GCA TTC TCC	308		
Met Ser Asn Ile Asn Ala Pro Lys Asp Leu Leu His Arg Ala Phe Ser			
55	60	65	70
GTG TTT CTC TTC CGC CCA TCG GAC GGA GCA CTC CTG CTT CAG CGA AGA	356		
Val Phe Leu Phe Arg Pro Ser Asp Gly Ala Leu Leu Leu Gln Arg Arg			
75	80	85	
GCG GAC GAG AAG ATT ACG TTC CCT GGA ATG TGG ACC AAC ACG TGT TGC	404		
Ala Asp Glu Lys Ile Thr Phe Pro Gly Met Trp Thr Asn Thr Cys Cys			
90	95	100	
AGT CAT CCT TTG AGC ATC AAG GGC GAG GTT GAA GAG GAG AAC CAG ATC	452		
Ser His Pro Leu Ser Ile Lys Gly Glu Val Glu Glu Asn Gln Ile			
105	110	115	
GGT GTT CGA CGA CCT GCG TCC CGA AAG TTG GAG CAC GAG CTT CGC GTG	500		
Gly Val Arg Arg Ala Ala Ser Arg Lys Leu Glu His Glu Leu Gly Val			
120	125	130	
CCT ACA TCG TCG ACT CCG CCC GAC TCG TTC ACC TAC CTC ACT AGG ATA	548		
Pro Thr Ser Ser Thr Pro Pro Asp Ser Phe Thr Tyr Leu Thr Arg Ile			
135	140	145	150

CAT TAC CTC GCT CCG AGT GAC GGA CTC TGG GGA GAA CAC GAG ATC GAC 596  
 His Tyr Leu Ala Pro Ser Asp Gly Leu Trp Gly Glu His Glu Ile Asp  
 155 160 165

TAC ATT CTC TTC TCA ACC ACA CCT ACA GAA CAC ACT GGA AAC CCT AAC 644  
 Tyr Ile Leu Phe Ser Thr Thr Pro Thr Glu His Thr Gly Asn Pro Asn  
 170 175 180

GAA GTC TCT GAC ACT CGA TAT GTC ACC AAG CCC GAG CTC CAG GCC ATG 692  
 Glu Val Ser Asp Thr Arg Tyr Val Thr Lys Pro Glu Leu Gln Ala Met  
 185 190 195

TTT GAG GAC GAG TCT AAC TCA TTT ACC CCT TGG TTC AAG TTG ATT GCC 740  
 Phe Glu Asp Glu Ser Asn Ser Phe Thr Pro Trp Phe Lys Leu Ile Ala  
 200 205 210

CGA GAC TTC CTG TTT CGC TGG TGG GAT CAA CTT CTC GCC AGA CGA AAT 788  
 Arg Asp Phe Leu Phe Gly Trp Trp Asp Gln Leu Leu Ala Arg Arg Asn  
 215 220 225 230

GAA AAG CGT GAG GTC GAT GCC AAA TCG TTG CAG GAT CTC TCG GAC AAC 836  
 Glu Lys Gly Glu Val Asp Ala Lys Ser Leu Glu Asp Leu Ser Asp Asn  
 235 240 245

AAA CTC TGG AAG ATG TAGTCGACC CTTCTTCTG TACAGTCATC TCAGTTGCC 890  
 Lys Val Trp Lys Met \*\*\*  
 250

TGTTGGTTGC TTGCTTCTTG CTCTCTTTC TATATATCTT TTTCTTGCC TGGTAGACT 950

TGATCTTCT ACATAGCATA CGCATACATA CATAAACTCT ATTTCTTGT TTTATCTCT 1010

CTTCTAACGG AATCTTCAAG ATCAATTCT TTTGGGCTA CAACATTCA GATCAATGTT 1070

GCTTTTCAGA CTACAAAAAA AAAAAAAA 1099

配列番号 : 5

配列の長さ : 1074

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : cDNA

起源

生物名 : *Haematococcus pluvialis*

株名 : NIES-144

配列の特徴

特徴を表す記号 : CDS

存在位置 : 145 . . 921

特徴を決定した方法 : E

配列

ATCGCTACTT CGAACCTGGC CCGGCGGCAG TCCGATGACG CGATGCTTCG TTCTGTTCCCTC 60

AGAGGCCCTCA CGCATTCCC CCGCGTGAAC TCCGCGCAGC AGCCCAGCTG TGCACACGGC 120

CCACTCCAGT TTAGGCCAG AAGC ATG CAG CTG CTT GCC GAG GAC CCC ACA GAC 179

Met Gin Leu Leu Ala Glu Asp Arg Thr Asp

5 10

CAT ATG AGG GCT GCA ACT ACC TGG GCA GGC GGG CAG TCG CAG GAT GAG 222

His Met Arg Gly Ala Ser Thr Trp Ala Gly Gly Gln Ser Gln Asp Glu

15 20 25

CTG ATG CTG AAG GAC GAG TGC ATC TTG GTG GAT GCT GAC GAC AAC ATT 270

Leu Met Leu Lys Asp Glu Cys Ile Leu Val Asp Ala Asp Asp Asn Ile

30 35 40

ACA GCC CAT GTC AGC AAG CTG GAG TGC CAC AAG TTC CTA CCA CAT CAG 318

Thr Gly His Val Ser Lys Leu Glu Cys His Lys Phe Leu Pro His Gln  
 45 50 55  
 CCT GCA CGC CTG CTG CAC CGG GCC TTC TCT GTA TTC CTG TTT GAC GAC 366  
 Pro Ala Gly Leu Leu His Arg Ala Phe Ser Val Phe Leu Phe Asp Asp  
 60 65 70  
 CAG GGG CGA CTG CTG CAA CAG CGT GCA CGA TCA AAA ATC ACA TTC 414  
 Gln Gly Arg Leu Leu Leu Gln Gln Arg Ala Arg Ser Lys Ile Thr Phe  
 75 80 85 90  
 CCC ACT GTG TGG ACC AAC ACC TGC TGC ACC CAC CCT CTA CAT GGG CAG 462  
 Pro Ser Val Trp Thr Asn Thr Cys Cys Ser His Pro Leu His Gln  
 95 100 105  
 ACC CCA GAT GAG GTG GAC CAA CTA AGC CAG GTG GCC GAC GGC ACA GTA 510  
 Thr Pro Asp Glu Val Asp Gln Leu Ser Gln Val Ala Asp Gly Thr Val  
 110 115 120  
 CCT GGC GCA AAG GCT GCT GCC ATC CGC AAG TTG GAG CAC GAG CTG GGG 558  
 Pro Gly Ala Lys Ala Ala Ala Ile Arg Lys Leu Glu His Glu Leu Gly  
 125 130 135  
 ATA CCA GCG CAC CAG CTG CCG GCC AGC GCG TTT CGC TTC CTC ACG CGT 606  
 Ile Pro Ala His Gln Leu Pro Ala Ser Ala Phe Arg Phe Leu Thr Arg  
 140 145 150  
 TTG CAC TAC TGC GCC GCG GAC GTG CAG CCG GCT GCG ACA CAA TCA GCA 654  
 Leu His Tyr Cys Ala Ala Asp Val Gln Pro Ala Ala Thr Gln Ser Ala  
 155 160 165 170  
 CTC TCG GGC GAG CAC GAA ATG GAC TAC ATC TTA TTC ATC CGG GCC AAC 702  
 Leu Trp Gly Glu His Glu Met Asp Tyr Ile Leu Phe Ile Arg Ala Asn  
 175 180 185  
 GTC ACC CTT GCG CCC AAC CCT GAC GAG GTG GAC GAA GTC AGG TAC GTG 750  
 Val Thr Leu Ala Pro Asn Pro Asp Glu Val Asp Glu Val Arg Tyr Val  
 190 195 200

ACG CAG GAG GAG CTG CGG CAG ATG ATG CAG CCG GAC AAT GGG TTG CAA	798		
Thr Gln Glu Glu Leu Arg Gln Met Met Gln Pro Asp Asn Gly Leu Gln			
205	210	215	
TCG TCG CCG TGG TTT CGC ATC ATC GCC CCC CGC TTC CTT GAG CGC TGG	846		
Trp Ser Pro Trp Phe Arg Ile Ile Ala Ala Arg Phe Leu Glu Arg Trp			
220	225	230	
TCG GCT GAC CTA GAC GCG CCC CTG AAC ACT GAC AAA CAC GAG GAT TGG	894		
Trp Ala Asp Leu Asp Ala Ala Leu Asn Thr Asp Lys His Glu Asp Trp			
235	240	245	250
GGA ACG GTG CAT CAC ATC AAC GAA GCG TGA AAACAG AAGCTGTAGG	940		
Gly Thr Val His His Ile Asn Glu Ala ***			
255			
ATGTCAAGAC ACCTCATGAG GGGGCTTGGC ATCTTGGCGG CTTCGTATCT CTTTTACTG	1000		
AGACTGAACC TCCAGCTGGA GACAATGGTC AGCCCAATTG AACTTCCGC TGCAC TGAA	1060		
AAAAAAAAAA AAAA	1074		

配列番号： 6

配列の長さ： 1058

配列の型： 核酸

鎖の数： 二本鎖

トポロジー： 直鎖状

配列の種類： genome DNA

起源

生物名： *Saccharomyces cerevisiae*

株名： S288C

配列の特徴

特徴を表す記号： CDS

存在位置：187 . . 1050

特徴を決定した方法：S

## 配列

TCGATGGGGG TTGCCTTCT TTTTCGGTCT TAACTCCATT TATATTATT TATTCAATT 60  
 TATCTATTTA ACAGGAAACA GTTTCTACT CACAAGAAGG CGTATATCCC ACTTAATTCA 120  
 ATATTAGACT ATTGTATTT GGAATACAGG AACAGTAAAA ATAAGCCAAA AATTCAATTAC 180  
 ACCTCA ATG ACT GCC GAC AAC AAT ACT ATG CCC CAT GGT GCA GTA TCT ACT 231  
 Met Thr Ala Asp Asn Asn Ser Met Pro His Gly Ala Val Ser Ser  
 5 10 15  
 TAC GCC AAA TTA GTG CAA AAC CAA ACA CCT GAA GAC ATT TTG GAA GAG 279  
 Tyr Ala Lys Leu Val Gln Asn Gln Thr Pro Glu Asp Ile Leu Glu Glu  
 20 25 30  
 TTT CCT GAA ATT ATT CCA TTA CAA CAA AGA CCT AAT ACC CGA TCT AGT 327  
 Phe Pro Glu Ile Ile Pro Leu Gln Gln Arg Pro Asn Thr Arg Ser Ser  
 35 40 45  
 GAG ACC TCA AAT GAC GAA AGC GGA GAA ACA TGT TTT TCT GGT CAT CAT 375  
 Glu Thr Ser Asn Asp Glu Ser Gly Glu Thr Cys Phe Ser Gly His Asp  
 50 55 60  
 GAG GAG CAA ATT AAG TTA ATG AAT GAA AAT TGT ATT GTT TTG GAT TGG 423  
 Glu Glu Gln Ile Lys Leu Met Asn Glu Asn Cys Ile Val Leu Asp Trp  
 65 70 75  
 GAC GAT AAT GCT ATT GGT CCC GGT ACC AAG AAA CTT TGT CAT TTA ATG 471  
 Asp Asp Asn Ala Ile Gly Ala Gly Thr Lys Lys Val Cys His Leu Met  
 80 85 90 95  
 GAA AAT ATT GAA AAG GGT TTA CTA CAT CGT GCA TTC TCC GTC TTT ATT 519

Glu Asn Ile Glu Lys Gly Leu Leu His Arg Ala Phe Ser Val Phe Ile			
100	105	110	
TTC AAT GAA CAA GCT GAA TTA CTT TTA CAA CAA AGA GCC ACT GAA AAA			567
Phe Asn Glu Gln Gly Glu Leu Leu Leu Gln Gln Arg Ala Thr Glu Lys			
115	120	125	
ATA ACT TTC CCT GAT CTT TGG ACT AAC ACA TGC TGC TCT CAT CCA CTA			615
Ile Thr Phe Pro Asp Leu Trp Thr Asn Thr Cys Cys Ser His Pro Leu			
130	135	140	
TGT ATT GAT GAC GAA TTA GGT TTG AAG GGT AAG CTA GAC GAT AAC ATT			663
Cys Ile Asp Asp Glu Leu Gly Leu Lys Gly Lys Leu Asp Asp Lys Ile			
145	150	155	
AAG CCC GCT ATT ACT GCG GCG GTG AGA AAA CTA GAT CAT GAA TTA GGT			711
Lys Gly Ala Ile Thr Ala Ala Val Arg Lys Leu Asp His Glu Leu Gly			
160	165	170	175
ATT CCA GAA GAT GAA ACT AAG ACA AGG GCT AAG TTT CAC TTT TTA AAC			759
Ile Pro Glu Asp Glu Thr Lys Thr Arg Gly Lys Phe His Phe Leu Asn			
180	185	190	
ACA ATC CAT TAC ATG CCA CCA AGC AAT GAA CCA TGG GGT GAA CAT GAA			807
Arg Ile His Tyr Met Ala Pro Ser Asn Glu Pro Trp Gly Glu His Glu			
195	200	205	
ATT GAT TAC ATC CTA TTT TAT AAG ATC AAC GCT AAA GAA AAC TTG ACT			855
Ile Asp Tyr Ile Leu Phe Tyr Lys Ile Asn Ala Lys Glu Asn Leu Thr			
210	215	220	
GTC AAC CCA AAC GTC AAT GAA GTT AGA GAC TTC AAA TGG GTT TCA CCA			903
Val Asn Pro Asn Val Asn Glu Val Arg Asp Phe Lys Trp Val Ser Pro			
225	230	235	
AAT GAT TTG AAA ACT ATG TTT GCT GAC CCA AGT TAC AAC TTT ACG CCT			951
Asn Asp Leu Lys Thr Met Phe Ala Asp Pro Ser Tyr Lys Phe Thr Pro			
240	245	250	255

TGG TTT AAG ATT ATT TGC GAG AAT TAC TTA TTC AAC TGG TGG GAG CAA 999

Trp Phe Lys Ile Ile Cys Glu Asn Tyr Leu Phe Asn Trp Trp Glu Gln

260

265

270

TTA GAT GAC CTT TCT GAA GTG GAA AAT GAC AGC CAA ATT CAT AGA ATG 1047

Leu Asp Asp Leu Ser Glu Val Glu Asn Asp Arg Gln Ile His Arg Met

275

280

285

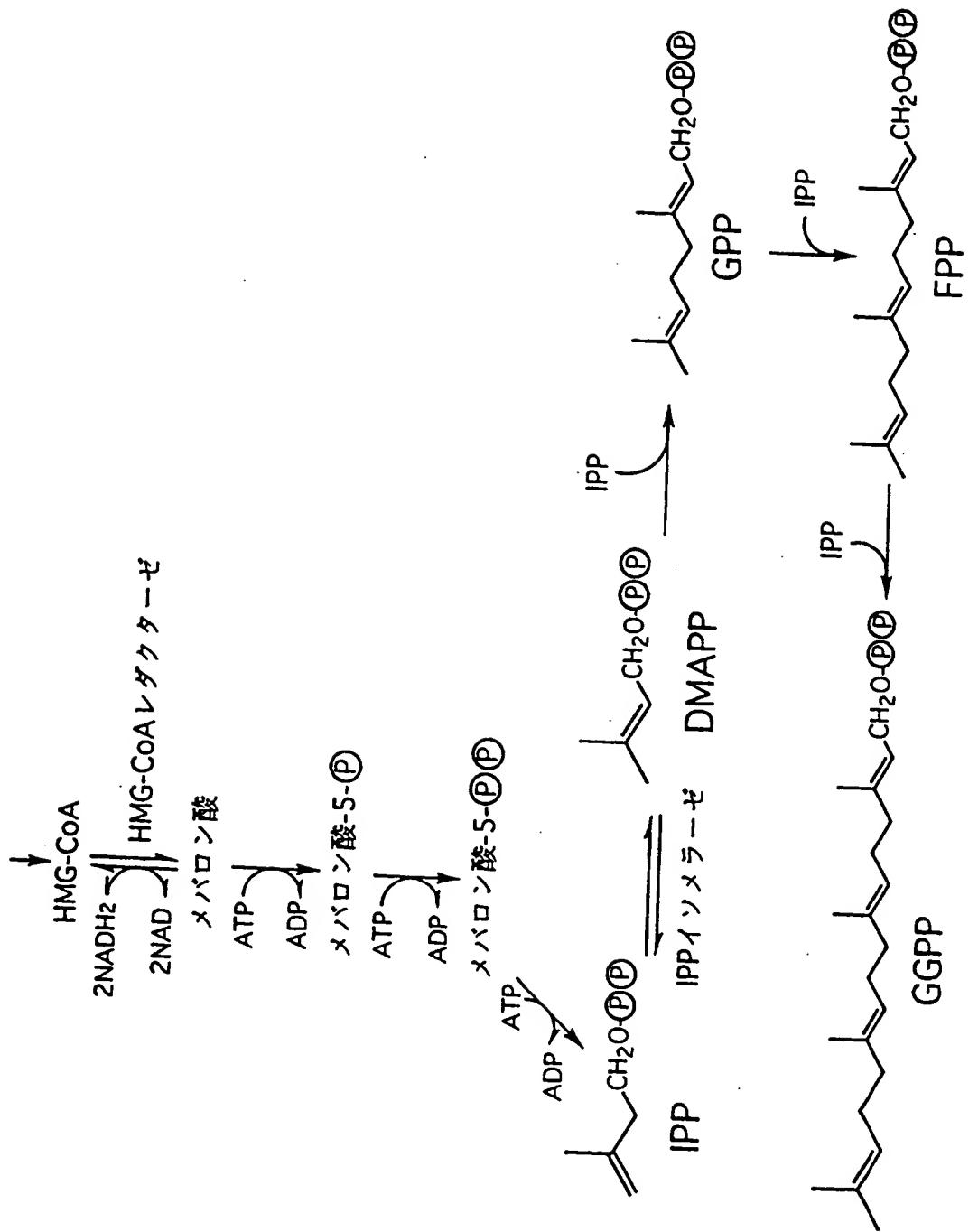
CTA TAA CAACG 1058

Leu \*\*\*

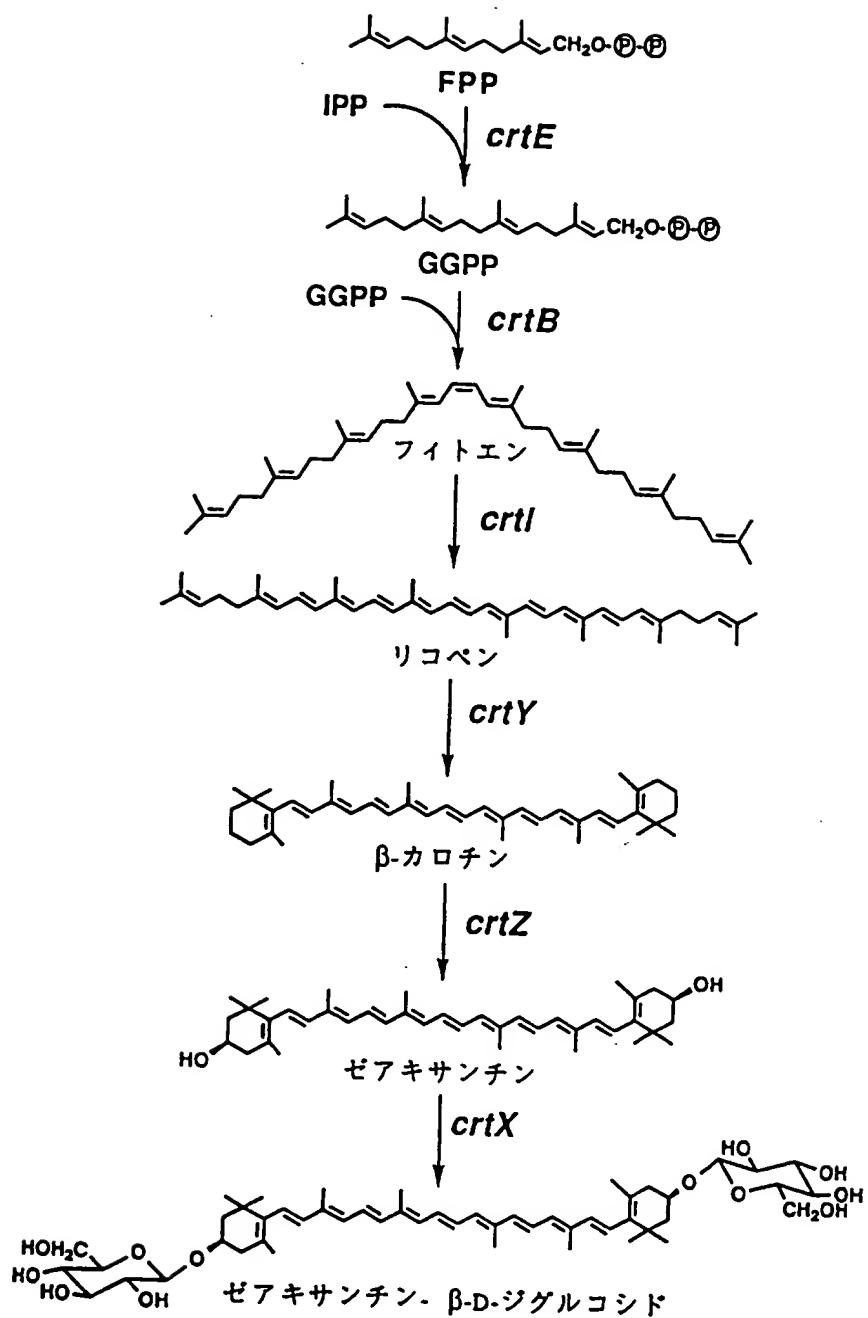
## 請 求 の 範 囲

1. カロチノイドの生産量を増量させる特性を有し、アミノ酸配列が実質的に配列番号 1 に示した配列を有するポリペプチドをコードする塩基配列を含むDNA鎖、またはそれとハイブリダイズするDNA鎖。
2. カロチノイドの生産量を増量させる特性を有し、アミノ酸配列が実質的に配列番号 2 に示した配列を有するポリペプチドをコードする塩基配列を含むDNA鎖、またはそれとハイブリダイズするDNA鎖。
3. 請求項 1～2 のいずれか 1 項に記載のDNA鎖をカロチノイド産生微生物に導入して該形質転換微生物を培地で培養し、培養物のカロチノイド含量を増量させることを特徴とする、カロチノイドの製造法。
4. アミノ酸配列が実質的に配列番号 3 に示した配列を有するポリペプチドをコードする塩基配列を含むDNA鎖、またはそれとハイブリダイズするDNA鎖をカロチノイド産生微生物に導入して該形質転換微生物を培地で培養し、培養物のカロチノイド含量を増量させることを特徴とする、カロチノイドの製造法。

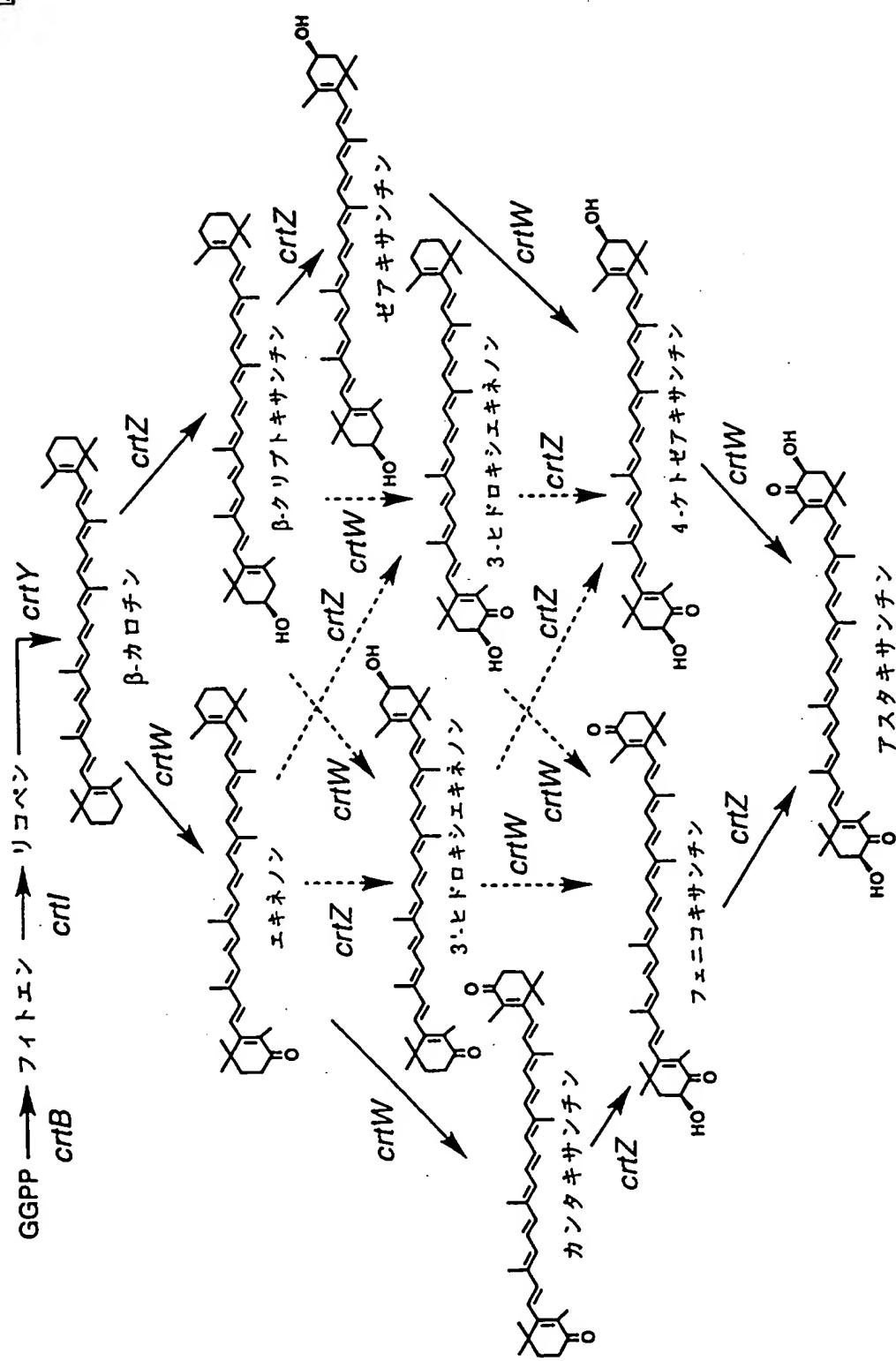
第1図



第2図



第3図



## 第4図

A

9	18	27	36	45	54
ATG TCC ATG CCC AAC ATT GTT CCC CCC GCC GAG GTC CGA ACC GAA GGA CTC AGT	Met Ser Met Pro Asn Ile Val Pro Pro Ala Glu Val Arg Thr Glu Gly Leu Ser				
63	72	81	90	99	108
TTA GAA GAG TAC GAT GAG GAG CAG GTC AGG CTG ATG GAG GAG CGA TGT ATT CTT	Leu Glu Glu Tyr Asp Glu Glu Gln Val Arg Leu Met Glu Glu Arg Cys Ile Leu				
117	126	135	144	153	162
GTT AAC CCG GAC GAT GTG GCC TAT GGA GAG GCT TCG AAA AAG ACC TGC CAC TTG	Val Asn Pro Asp Asp Val Ala Tyr Gly Glu Ala Ser Lys Lys Thr Cys His Leu				
171	180	189	198	207	216
ATG TCC AAC ATC AAC GCG CCC AAG GAC CTC CTC CAC CGA GCA TTC TCC GTG TTT	Met Ser Asn Ile Asn Ala Pro Lys Asp Leu Leu His Arg Ala Phe Ser Val Phe				
225	234	243	252	261	270
CTC TTC CGC CCA TCG GAC GGA GCA CTC CTG CTT CAG CGA AGA GCG GAC GAG AAG	Leu Phe Arg Pro Ser Asp Gly Ala Leu Leu Gln Arg Arg Ala Asp Glu Lys				
279	288	297	306	315	324
ATT ACG TTC CCT GGA ATG TGG ACC AAC ACG TGT TGC AGT CAT CCT TTG AGC ATC	Ile Thr Phe Pro Gly Met Trp Thr Asn Thr Cys Cys Ser His Pro Leu Ser Ile				
333	342	351	360	369	378
AAG GGC GAG GTT GAA GAG GAG AAC CAG ATC GGT GTT CGA CGA GCT GCG TCC CGA	Lys Gly Glu Val Glu Glu Asn Gln Ile Gly Val Arg Arg Ala Ala Ser Arg				
387	396	405	414	423	432
AAG TTG GAG CAC GAG CTT GGC GTG CCT ACA TCG TCG ACT CCG CCC GAC TCG TTC	Lys Leu Glu His Glu Leu Gly Val Pro Thr Ser Ser Thr Pro Pro Asp Ser Phe				
441	450	459	468	477	486
ACC TAC CTC ACT AGG ATA CAT TAC CTC GCT CCG AGT GAC GGA CTC TGG GGA GAA	Thr Tyr Leu Thr Arg Ile His Tyr Leu Ala Pro Ser Asp Gly Leu Trp Gly Glu				
495	504	513	522	531	540
CAC GAG ATC GAC TAC ATT CTC TTC TCA ACC ACA CCT ACA GAA CAC ACT GGA AAC	His Glu Ile Asp Tyr Ile Leu Phe Ser Thr Thr Pro Thr Glu His Thr Gly Asn				
549	558	567	576	585	594
CCT AAC GAA GTC TCT GAC ACT CGA TAT GTC ACC AAG CCC GAG CTC CAG GCG ATG	Pro Asn Glu Val Ser Asp Thr Arg Tyr Val Thr Lys Pro Glu Leu Gln Ala Met				
					198

第5図

603	612	621	630	639	648	
TTT GAG GAC GAG TCT AAC TCA TTT ACC CCT TGG TTC AAG TTG ATT GCC CGA GAC	Phe Glu Asp Glu Ser Asn Ser Phe Thr Pro Trp Phe Lys Leu Ile Ala Arg Asp					
						216
657	666	675	684	693	702	
TTC CTG TTT GGC TGG TGG GAT CAA CTT CTC GCC AGA CGA AAT GAA AAG GGT GAG	Phe Leu Phe Gly Trp Trp Asp Gln Leu Leu Ala Arg Arg Asn Glu Lys Gly Glu					
						234
711	720	729	738	747	756	
GTC GAT GCC AAA TCG TTG GAG GAT CTC TCG GAC AAC AAA GTC TGG AAG ATG TAG	Val Asp Ala Lys Ser Leu Glu Asp Leu Ser Asp Asn Lys Val Trp Lys Met ***					
						251
						B

## 第6図

C  
 ↓

9	18	27	36	45	54
ATG CAG CTG CTT GCC GAG GAC CGC ACA GAC CAT ATG AGG GGT GCA AGT ACC TGG					
Met Gln Leu Leu Ala Glu Asp Arg Thr Asp His Met Arg Gly Ala Ser Thr Trp					
					18
63	72	81	90	99	108
GCA GGC GGG CAG TCG CAG GAT GAG CTG ATG CTG AAG GAC GAG TGC ATC TTG GTG					
Ala Gly Gly Gln Ser Gln Asp Glu Leu Met Leu Lys Asp Glu Cys Ile Leu Val					36
117	126	135	144	153	162
GAT GCT GAC GAC AAC ATT ACA GGC CAT GTC AGC AAG CTG GAG TGC CAC AAG TTC					
Asp Ala Asp Asp Asn Ile Thr Gly His Val Ser Lys Leu Glu Cys His Lys Phe					54
171	180	189	198	207	216
CTA CCA CAT CAG CCT GCA GGC CTG CTG CAC CGG GCC TTC TCT GTA TTC CTG TTT					
Leu Pro His Gln Pro Ala Gly Leu Leu His Arg Ala Phe Ser Val Phe Leu Phe					72
225	234	243	252	261	270
GAC GAC CAG GGG CGA CTG CTG CAA CAG CGT GCA CGA TCA AAA ATC ACA TTC					
Asp Asp Gln Gly Arg Leu Leu Gln Gln Arg Ala Arg Ser Lys Ile Thr Phe					90
279	288	297	306	315	324
CCC AGT GTG TGG ACC AAC ACC TGC TGC AGC CAC CCT CTA CAT GGG CAG ACC CCA					
Pro Ser Val Trp Thr Asn Thr Cys Cys Ser His Pro Leu His Gly Gln Thr Pro					108
333	342	351	360	369	378
GAT GAG GTG GAC CAA CTA AGC CAG GTG GCC GAC GGC ACA GTA CCT GGC GCA AAG					
Asp Glu Val Asp Gln Leu Ser Gln Val Ala Asp Gly Thr Val Pro Gly Ala Lys					126
387	396	405	414	423	432
GCT GCT GCC ATC CGC AAG TTG GAG CAC GAG CTG GGG ATA CCA GCG CAC CAG CTG					
Ala Ala Ala Ile Arg Lys Leu Glu His Glu Leu Gly Ile Pro Ala His Gln Leu					144
441	450	459	468	477	486
CCG GCC AGC GCG TTT CGC TTC CTC ACG CGT TTG CAC TAC TGC GCC GCG GAC GTG					
Pro Ala Ser Ala Phe Arg Phe Leu Thr Arg Leu His Tyr Cys Ala Ala Asp Val					162
495	504	513	522	531	540
CAG CCG GCT GCG ACA CAA TCA GCA CTC TGG GCC GAG CAC GAA ATG GAC TAC ATC					
Gln Pro Ala Ala Thr Gln Ser Ala Leu Trp Gly Glu His Glu Met Asp Tyr Ile					180
549	558	567	576	585	594
TTA TTC ATC CGG GCC AAC GTC ACC CTT GCG CCC AAC CCT GAC GAG GTG GAC GAA					
Leu Phe Ile Arg Ala Asn Val Thr Leu Ala Pro Asn Pro Asp Glu Val Asp Glu					198

第7回

603	612	621	630	639	648															
GTC	AGG	TAC	GTG	ACG	CAG	GAG	CTG	CGG	CAG	ATG	ATG	CAG	CCG	GAC	AAT	GGG				
Val		Arg	Tyr	Val	Thr	Gln	Glu	Glu	Leu	Arg	Gln	Met	Met	Gln	Pro	Asp	Gly			
																216				
657	666	675	684	693	702															
TTG	CAA	TGG	TCG	CCG	TGG	TTT	CGC	ATC	ATC	GCC	GCG	CGC	TTC	CTT	GAG	CGC	TGG			
Leu	Gln	Trp	Ser	Pro	Trp	Phe	Arg	Ile	Ile	Ala	Ala	Arg	Phe	Leu	Glu	Arg	Trp			
																234				
711	720	729	738	747	756															
TGG	GCT	GAC	CTA	GAC	GCG	GCC	CTG	AAC	ACT	GAC	AAA	CAC	GAG	GAT	TGG	GGA	ACG			
Trp	Ala	Asp	Leu	Asp	Ala	Ala	Leu	Asn	Thr	Asp	Lys	His	Glu	Asp	Trp	Gly	Thr			
																252				
765	774	780																		
GTG	CAT	CAC	ATC	AAC	GAA	GCG	TGA													
Val	His	His	Ile	Asn	Glu	Ala	***													
259↑ D																				

## 第8図

E

```

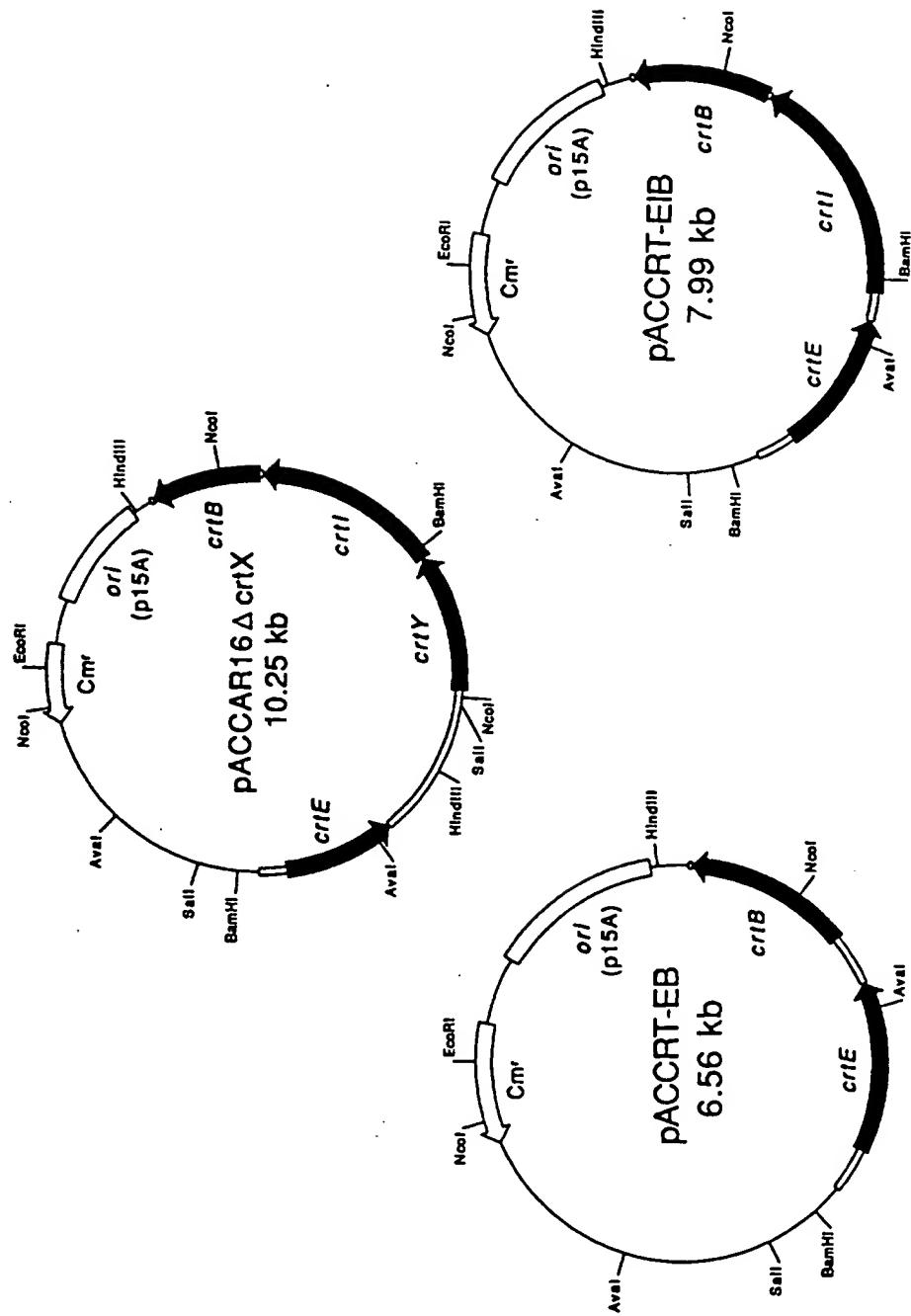
      9       18       27       36       45       54
ATG ACT GCC GAC AAC AAT AGT ATG CCC CAT GGT GCA GTA TCT AGT TAC GCC AAA
Met Thr Ala Asp Asn Asn Ser Met Pro His Gly Ala Val Ser Ser Tyr Ala Lys
                                         18
      63       72       81       90       99       108
TTA GTG CAA AAC CAA ACA CCT GAA GAC ATT TTG GAA GAG TTT CCT GAA ATT ATT
Leu Val Gln Asn Gln Thr Pro Glu Asp Ile Leu Glu Glu Phe Pro Glu Ile Ile
                                         36
      117      126      135      144      153      162
CCA TTA CAA CAA AGA CCT AAT ACC CGA TCT AGT GAG ACG TCA AAT GAC GAA AGC
Pro Leu Gln Gln Arg Pro Asn Thr Arg Ser Ser Glu Thr Ser Asn Asp Glu Ser
                                         54
      171      180      189      198      207      216
GGA GAA ACA TGT TTT TCT GGT CAT GAT GAG GAG CAA ATT AAG TTA ATG AAT GAA
Gly Glu Thr Cys Phe Ser Gly His Asp Glu Gln Ile Lys Leu Met Asn Glu
                                         72
      225      234      243      252      261      270
AAT TGT ATT GTT TTG GAT TGG GAC GAT AAT GCT ATT GGT GCC GGT ACC AAG AAA
Asn Cys Ile Val Leu Asp Trp Asp Asp Asn Ala Ile Gly Ala Gly Thr Lys Lys
                                         90
      279      288      297      306      315      324
GTT TGT CAT TTA ATG GAA AAT ATT GAA AAG GGT TTA CTA CAT CGT GCA TTC TCC
Val Cys His Leu Met Glu Asn Ile Glu Lys Gly Leu Leu His Arg Ala Phe Ser
                                         108
      333      342      351      360      369      378
GTC TTT ATT TTC AAT GAA CAA GGT GAA TTA CTT TTA CAA CAA AGA GCC ACT GAA
Val Phe Ile Phe Asn Glu Gln Gly Glu Leu Leu Gln Gln Arg Ala Thr Glu
                                         126
      387      396      405      414      423      432
AAA ATA ACT TTC CCT GAT CTT TGG ACT AAC ACA TGC TGC TCT CAT CCA CTA TGT
Lys Ile Thr Phe Pro Asp Leu Trp Thr Asn Thr Cys Cys Ser His Pro Leu Cys
                                         144
      441      450      459      468      477      486
ATT GAT GAC GAA TTA GGT TTG AAG GGT AAG CTA GAC GAT AAG ATT AAG GGC GCT
Ile Asp Asp Glu Leu Gly Leu Lys Gly Lys Leu Asp Asp Lys Ile Lys Gly Ala
                                         162
      495      504      513      522      531      540
ATT ACT GCG GCG GTG AGA AAA CTA GAT CAT GAA TTA GGT ATT CCA GAA GAT GAA
Ile Thr Ala Ala Val Arg Lys Leu Asp His Glu Leu Gly Ile Pro Glu Asp Glu
                                         180

```

## 第9図

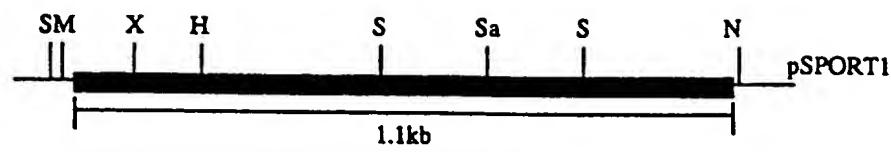
549	558	567	576	585	594
ACT AAG ACA AGG GGT AAG TTT CAC TTT TTA AAC AGA ATC CAT TAC ATG GCA CCA					
Thr Lys Thr Arg Gly Lys Phe His Phe Leu Asn Arg Ile His Tyr Met Ala Pro					
					198
603	612	621	630	639	648
AGC AAT GAA CCA TGG GGT GAA CAT GAA ATT GAT TAC ATC CTA TTT TAT AAG ATC					
Ser Asn Glu Pro Trp Gly Glu His Ile Asp Tyr Ile Leu Phe Tyr Lys Ile					
					216
657	666	675	684	693	702
AAC GCT AAA GAA AAC TTG ACT GTC AAC CCA AAC GTC AAT GAA GTT AGA GAC TTC					
Asn Ala Lys Glu Asn Leu Thr Val Asn Pro Asn Val Asn Glu Val Arg Asp Phe					
					234
711	720	729	738	747	756
AAA TGG GTT TCA CCA AAT GAT TTG AAA ACT ATG TTT GCT GAC CCA AGT TAC AAG					
Lys Trp Val Ser Pro Asn Asp Leu Lys Thr Met Phe Ala Asp Pro Ser Tyr Lys					
					252
765	774	783	792	801	810
TTT ACG CCT TGG TTT AAG ATT ATT TGC GAG AAT TAC TTA TTC AAC TGG TGG GAG					
Phe Thr Pro Trp Phe Lys Ile Ile Cys Glu Asn Tyr Leu Phe Asn Trp Trp Glu					
					270
819	828	837	846	855	864
CAA TTA GAT GAC CTT TCT GAA GTG GAA AAT GAC AGG CAA ATT CAT AGA ATG CTA					
Gln Leu Asp Asp Leu Ser Glu Val Asn Asp Arg Gln Ile His Arg Met Leu					
					288
867					
TAA					F
***					

第10図

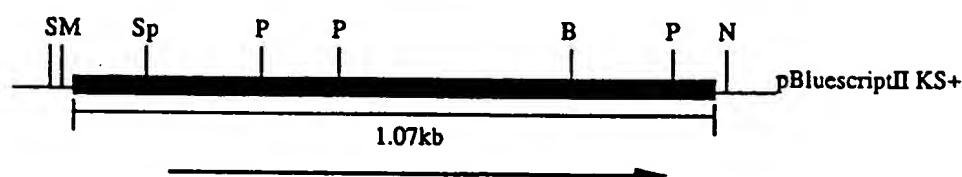


## 第11図

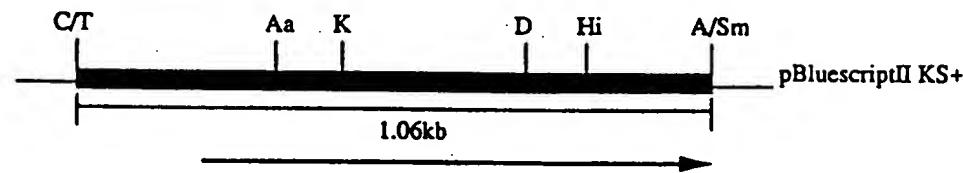
pRH1

*Phaffia rhodozyma* IPP イソメラーゼ

pHP11

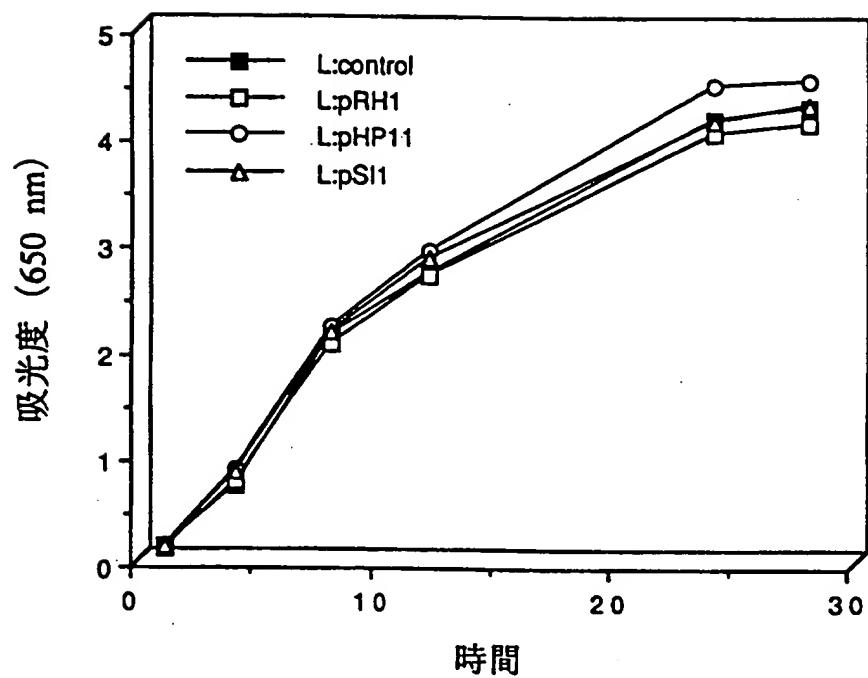
*Haematococcus pluvialis* IPP イソメラーゼ

pSI1

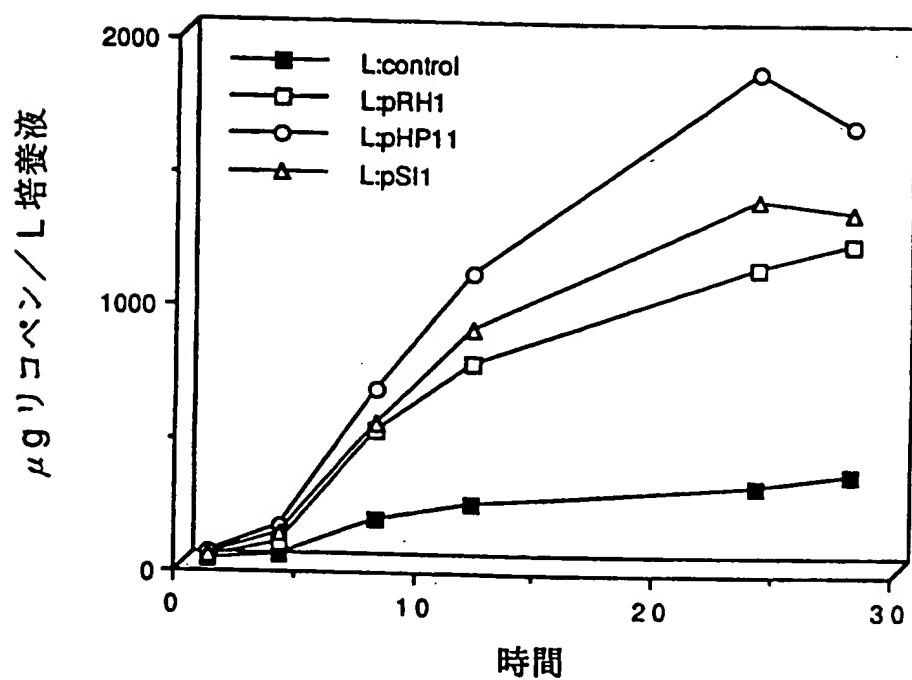
*Saccharomyces cerevisiae* IPP イソメラーゼ

Aa: AatII, A: AccII, B:BssHII, D:DraI, Hi:HincII,  
 H:HpaI, K:KpnI, M:MulI, N:NotI, P:PstI, Sa:SacI,  
 S:Sall, Sp:SphI, X:XbaI

第12図



第13図



## 第14図

大腸菌	μg カロチン / g 乾重量	生産比
L: control	228	1
L: pRH1	825	3.6
L: pHPII	1029	4.5
L: pSI1	859	3.8
β: control	488	1
β: pRH1	709	1.5
P: control	246	1
P: pRH1	413	1.7
P: pHPII	504	2.1



[ 特許手続上の微生物の寄託の国際的承認  
に関するブダペスト条約 ]

下記国際寄託当局によって規則 7. 1 に従い  
発行される

原寄託についての受託証

氏名（名称） 飲料麦酒株式会社  
寄託者 代表取締役社長 真鍋 主作  
あて名 ⑩ 150  
東京都渋谷区神宮前6丁目26番1号

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL DEPOSIT

issued pursuant to Rule 7.1 by the INTERNATIONAL DEPOSITORY AUTHORITY identified at the bottom of this page.

I. 微生物の表示

(寄託者が付した識別のための表示)  
JM109 (pRHI)

(受託番号)  
FERM BP- 5032

II. 科学的性質及び分類学上の位置

I 横の微生物には、次の事項を記載した文書が添付されていた。

- 科学的性質
- 分類学上の位置

III. 受領及び受託

本国際寄託当局は、平成 7年 3月 6日（原寄託日）に受領した I 横の微生物を受託する。

IV. 移管請求の受領

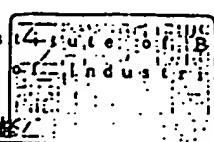
本国際寄託当局は、  
そして、 年 月 日（原寄託日）に I 横の微生物を受領した。  
年に原寄託よりブダペスト条約に基づく寄託への移管請求を受領した。

V. 国際寄託当局

通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所

名称： National Institute for Science and Human-Technology  
Agency of Industrial Science and Technology

所長 鈴木 修



Osamu Suzuki, Dr., DIRECTOR GENERAL.

あて名：日本茨城県つくば市東1丁目1番3号（郵便番号305）  
1-3, Higashi 1 chome Tsukuba-shi Ibaraki-ken  
305, JAPAN

## 国際様式 INTERNATIONAL FORM



[ 特許手続上の微生物の寄託の国際的承認に関するブダペスト条約 ]

下記国際寄託当局によって規則7.1に従い  
発行される

## 原寄託についての受託証

氏名（名称） 獻醸麥酒株式会社  
寄託者 代表取締役社長 真鍋圭作  
あて名 ④ 150  
東京都渋谷区神宮前6丁目26番1号

## BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE

## RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL DEPOSIT

issued pursuant to Rule 7.1 by the  
INTERNATIONAL DEPOSITORY AUTHORITY  
identified at the bottom of this  
page.

## I. 微生物の表示

（寄託者が付した識別のための表示）  
JM109 (pHP11)

（受託番号）  
FERM BP- 5031

## II. 科学的性質及び分類学上の位置

I欄の微生物には、次の事項を記載した文書が添付されていた。

- 科学的性質  
 分類学上の位置

## III. 受領及び受託

本国際寄託当局は、平成 7年 3月 6日（原寄託日）に受領した I 欄の微生物を受託する。

## IV. 移管請求の受領

本国際寄託当局は、 年 月 日（原寄託日）に I 欄の微生物を受領した。  
そして、 年 月 日に原寄託よりブダペスト条約に基づく寄託への移管請求を受領した。

## V. 国際寄託当局

通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所

名称： National Institute of Science and Human-Technology  
Agency of Industrial Science and Technology

所長 鈴木 伸一  
Osamu Suzuki, Director, DIRECTOR GENERAL.

あて名：日本茨城県つくば市東1丁目1番3号（郵便番号305）  
1-3, Higashi 1 chome Tsukuba-shi Ibaraki-ken  
305. JAPAN

国際様式 INTERNATIONAL FORM



[ 特許手続上の微生物の寄託の国際的承認  
に関するブダペスト条約 ]

下記国際寄託当局によって規則7. 1に従い  
発行される

原寄託についての受託証

氏名（名称） 麦酒株式会社  
寄託者 代表取締役社長 真鍋 生作  
あて名 ④ 150 殿  
東京都渋谷区神宮前6丁目26番1号

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL DEPOSIT

issued pursuant to Rule 7. 1 by the INTERNATIONAL DEPOSITORY AUTHORITY identified at the bottom of this page.

I. 微生物の表示

(寄託者が付した識別のための表示)  
JM109 (psi)

(受託番号)  
FERM BP- 5033

II. 科学的性質及び分類学上の位置

I欄の微生物には、次の事項を記載した文書が添付されていた。

- 科学的性質  
 分類学上の位置

III. 受領及び受託

本国際寄託当局は、平成 7年 3月 6日（原寄託日）に受領した I 欄の微生物を受託する。

IV. 移管請求の受領

本国際寄託当局は、 年 月 日（原寄託日）に I 欄の微生物を受領した。  
そして、 年 月 日に原寄託よりブダペスト条約に基づく寄託への移管請求を受領した。

V. 国際寄託当局

通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所

名称： National Institute of Bioscience and Human-Technology  
Agency of Industrial Science and Technology

所長 鈴木 伸一  
Osamu Suzuki, Dr., DIRECTOR GENERAL.

あて名： 日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号（郵便番号305）  
1-3, Higashi 1 chome Tsukuba-shi Ibaraki-ken  
305, JAPAN

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP96/00574

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl<sup>6</sup> C12N15/00, C12N9/90

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. Cl<sup>6</sup> C12N15/00, C12N9/90

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

BIOSIS PREVIEWS, CAS

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Chu-Biao Xue "A Covalently Constrained Congener of the <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Tridecapeptide Mating Pheromone Is an Aronist" J. Biol. Chem., Vol. 264, No. 32, p. 19161-19168	1 - 4
A	Ian P. street "Isopentenyldiphosphate: Dimethylallyldiphosphate Isomerase: Construction of a High-Level Heterologous Expression System for the Gene from <i>Saccharomyces cerevisiae</i> and Identification of an Active-site Nucleophile" Biochemistry, Vol. 29, p. 7351-7538	1 - 4

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

- \* Special categories of cited documents:
- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
June 3, 1996 (03. 06. 96)Date of mailing of the international search report  
June 11, 1996 (11. 06. 96)Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office  
Facsimile No.Authorized officer  
Telephone No.

## A. 発明の属する分野の分類(国際特許分類(IPC))

Int C1' C12N15/00 C12N 9/90

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料(国際特許分類(IPC))

Int C1' C12N15/00 C12N 9/90

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース(データベースの名称、調査に使用した用語)

BIOSIS PREVIEWS, CAS

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	Chu-Biao Xue 「A Covalently Constrained Congener of the <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Tridecapeptide Mating Pheromone Is an Aronist」 J. Biol. Chem., vol. 264, no. 32, p. 19161-19168	1-4
A	Ian P. street 「Isopentenyldiphosphate:Dimethylallyldiphosphate Isomerase: Construction of a High-Level Heterologous Expression System for the Gene from <i>Saccharomyces cerevisiae</i> and Identification of an Active-site Nucleophile」 Biochemistry, vol. 29, p. 7351-7538	1-4

 C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献(理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

## の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&amp;」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

03.06.96

国際調査報告の発送日

11.06.96

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官(権限のある職員)

富永みどり

印 4B 9152

電話番号 03-3581-1101 内線 3449